



**GUSTAVO LUIS LOPES SILVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO INDUZIDA POR CHOQUE  
TÉRMICO EM *Herbaspirillum seropedicae***

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná, como  
requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências – Bioquímica**

**Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de  
Souza**

**CURITIBA**

**2009**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**GUSTAVO LUIS LOPES SILVEIRA**

### **IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO INDUZIDA POR CHOQUE TÉRMICO EM *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Emanuel Maltempi de Souza  
Departamento de Bioquímica

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Bonatto  
Departamento de Bioquímica

Prof. Luíza Maria de Araújo  
Departamento de Bioquímica – UFPR

Prof. Luciano Fernandes Huergo  
Departamento de Bioquímica – UFPR

Dr<sup>a</sup> Daniela Fojo Chaves

Curitiba, 13 de fevereiro de 2009

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa por ter me aceitado no grupo de fixação de nitrogênio;

Ao Prof. Emanuel Maltempi de Souza pela orientação, atenção, discussões, sugestões, pelos recursos disponibilizados e confiança;

À Prof. Ana Cláudia Bonatto pela co-orientação, ajuda, sugestões e grande ajuda durante o período;

À Daniela Chaves, por todos os ensinamentos na área de proteoma, auxílio, sugestões que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Luciano Huergo pelas discussões de proteoma e cursos;

Ao Valter, D. Jú e Roseli Prado pela ajuda constante, interesse e apoio;

A coordenação do curso de pós-graduação em bioquímica, aos professores do departamento Bioquímica e todos os funcionários;

A todos os colegas do laboratório Renato, Pércio, Camila e Paula pelo bom convívio, amizade e prestatividade;

A toda turma de mestrado pelo companheirismo e amizade;

A todos os amigos do grupo de fixação de nitrogênio pelo bom convívio;

À CAPES, ao Genopar, Proteopar e Projeto Milênio pelos recursos disponibilizados;

À minha esposa Flávia pelo amor incondicional, companheirismo e apoio em todos os momentos;

Aos meus pais Guilherme e Irene, irmãos e toda a família pelo incentivo, torcida e carinho.

## RESUMO

Proteínas de choque térmico ou HSP (*Heat Shock Proteins*) constituem uma categoria de proteínas que têm sua expressão aumentada em resposta a condições de estresse, tais como variação de temperatura, presença de metal pesado, isquemia, exposição à radiação ionizante, anóxia, privação de glucose e uma variedade de agentes químicos. Esta resposta aparentemente é universal, ocorrendo tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos. As proteínas de choque térmico impedem a formação de agregados de proteínas desnaturadas e facilitam a manutenção de suas estruturas, o direcionamento para a membrana, a degradação ou a remoção de proteínas danificadas. Quando organismos não-estressados são expostos diretamente ao estresse térmico extremo, os resultados são danos celulares extensos e morte celular. Porém, quando estes organismos são primeiramente tratados com elevações moderadas de temperatura eles se tornam mais tolerantes a essas temperaturas extremas, mostrando que as proteínas de choque térmico têm um papel vital no desenvolvimento de indução de termotolerância e estas têm sido amplamente investigadas pelo seu potencial de influenciar a distribuição e abundância dos organismos.

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa e espiralada que possui metabolismo aeróbico e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. O presente estudo teve como objetivo a identificação de proteínas relacionadas à resposta ao estresse térmico em *H. seropedicae* através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Os resultados mostraram que as proteínas DnaK, GrpE, GroEL, GroES, IbpA e DapA encontram-se presentes após exposição a temperatura de 42°C durante trinta minutos. As chaperonas DnaK e GroEL foram identificadas na condição controle e condição estressada, porém suas co-chaperonas GrpE e GroES só foram identificadas na condição estressada. A proteína IbpA foi identificada em três “spots” distintos com diferentes pontos isoelétricos, assim como a co-chaperona GroES. A proteína DapA, encontrada em dois spots, foi identificada em ambas as condições, porém esta encontra-se com expressão diminuída após o choque térmico. As proteínas GroEL, GroES, IbpA e DapA que foram identificadas em mais de um “spot” nos géis, possivelmente apresentam alguma modificação pós-traducional.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; proteoma, eletroforese bidimensional, espectrometria de massas, choque térmico.

## ABSTRACT

Heat Shock Proteins (HSP) constitute a group of proteins that have their expression increased in response to stress conditions such as, temperature variations, heavy metals, ischemia, ionizing radiation, anoxia, glucose starvation and a range of chemical agents. This response is apparently universal, occurring in prokaryotes and eukaryotes. The heat shock proteins can prevent the formation of aggregates of denatured proteins and facilitate the maintenance of protein structure, the direction to the membrane and degradation or removal of damaged proteins. When non-stressed organisms are directly exposed to extreme heat stress, the results are extensive cell damage and cell death. However, when these organisms are first treated with mild elevations in temperature they become more tolerant to such extreme temperatures, showing that the heat shock proteins play a vital role in the development of induced thermotolerance. These proteins have been widely investigated for their potential to influence the distribution and abundance of organisms.

*Herbaspirillum seropedicae* is a gram-negative bacterium that has aerobic metabolism and the ability to fix atmospheric nitrogen. This study aims to identify proteins related to heat stress response in *H. seropedicae* through two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. The results showed that the proteins DnaK, GrpE, GroEL, GroES, IbpA and DapA are present after exposure to temperature of 42°C for thirty minutes. The chaperones DnaK and GroEL were identified in the control condition and stressed condition, but their co-chaperones GrpE and GroES were identified only on stressed condition. The IbpA protein and the co-chaperone GroES were identified in three different spots with different isoelectric points. The DapA protein, found in two spots, was identified in both conditions, with reduced expression after heat shock. The GroEL, GroES, IbpA and DapA proteins have been identified in multiple spots on the gels, suggesting some post-translation modification.

**Key words:** *Herbaspirillum seropedicae*, proteome, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, heat shock.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MAPA DE REFERÊNCIA DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE <i>H. seropedicae</i> .....	19
FIGURA 2 – MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA GroEL/GroES EM <i>E. coli</i> .....	24
FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA RENATURAÇÃO PROTÉICA.....	25
FIGURA 4 – PADRÃO DE RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> REPRESENTADO EM ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL.....	36
FIGURA 5 – PERFIL PROTÉICO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> EM ELETROFORESE BIDIMENSIONAL .....	38
FIGURA 6 – GEL REPRESENTATIVO DO PERFIL PROTEICO DE <i>H. seropedicae</i> MOSTRANDO OS PONTOS RETIRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO.....	39
FIGURA 7- ESPECTRO DE MASSAS DA PROTEÍNA IbpA de <i>H. seropedicae</i> .....	40
FIGURA 8 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA IbpA.....	44
FIGURA 9 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GrpE .....	46
FIGURA 10 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA GroEL.	47
FIGURA 11 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA GroES.....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PROTEÍNAS INDUZIDAS PELO CHOQUE TÉRMICO EM PROCARIOTOS.....	20
TABELA 2. SISTEMAS DE CONTROLE DE EXPRESSÃO INDUZIDA POR CHOQUE TÉRMICO EM BACTÉRIAS.....	22
TABELA 3 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RETIRADAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS.....	41



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
x g	gravidade
AA	aminoácido
ACN	acetonitrila
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	enzima que catalisa a hidrólise do ATP
BSA	albumina de soro bovino
CHAPS	ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
D.O.	densidade óptica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
EST	<i>Expressed <b>sequence</b> tag</i> (etiqueta de sequência expressa)
2D	bidimensional
HCCA	ácido α-ciano-4-hidroxiamínico
HSP	<i>heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
IEF	focalização isoeletrica
IPG	gradiente de pH imobilizado
kDa	quilodalton
kV	quilovolts
L	litro
m/z	razão massa/carga
mA	miliampere

MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i> (ionização dessorção a laser assistida por matriz)
mg	miligrama
Min	minuto
mL	mililitro
MS	espectrometria de massas
MM	massa molecular
nm	nanômetro
ORF	<i>open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
pb	pares de base
pI	ponto isoelétrico
PMF	impressão digital de peptídeos
Ppm	partes por milhão
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Sm	estreptomicina
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoracético
ToF	tempo de voo (time of flight)
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
Vhr	voltagem/hora

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	13
1.2 PROTEOMA.....	14
1.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.....	19
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	29
3.2 CHOQUE TÉRMICO.....	30
3.3 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL.....	30
3.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	31
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	32
3.5.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	32
3.5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 O PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> EM ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL É MODIFICADO APÓS CHOQUE TÉRMICO.....	35
4.2 ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DE CELULAS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> EM ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	35
4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> COM EXPRESSÃO ALTERADA APÓS O CHOQUE TÉRMICO.....	40
4.4 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	42

5 CONCLUSÕES.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* compreende um grupo de bactérias gram-negativas, espiraladas, geralmente vibrióides, algumas vezes helicoidais e móveis (BALDANI *et al.*, 1986; BODDEY *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 1992). Estas bactérias podem apresentar de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos, seu diâmetro foi estimado entre 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  e o comprimento pode variar entre 1,5 e 5,0  $\mu\text{m}$ . Apresentam metabolismo aeróbio típico, não fermentam açúcares e tem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

A inoculação de plantas com *Herbaspirillum* spp. pode resultar no aumento do crescimento vegetal e produtividade (REIS *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003a; JAMES *et al.*, 2002). Estes efeitos não são atribuídos somente a sua capacidade de fixar nitrogênio, mas também à produção de auxinas e giberelinas que podem induzir o crescimento da planta (BASTIÁN *et al.*, 1998).

A espécie *H. seropedicae* foi primeiramente isolada na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, em 1986, por BALDANI e colaboradores. Posteriormente, estirpes de *H. seropedicae* foram encontradas colonizando raízes, colmos ou folhas de milho, sorgo, arroz, gramíneas forrageiras, palmeiras, abacaxizeiros e bananeiras, além de raízes e colmos de cana-de-açúcar. Isolados desta espécie foram encontrados em outros países como, por exemplo, Índia, Austrália, Alemanha e Japão (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001; ELBELTAGY *et al.*, 2001).

*H. seropedicae* estirpe Z78 teve seu genoma seqüenciado e anotado pelo Programa Genoma do Paraná -GENOPAR, revelando um total de 4.720 genes com 5.418.348 pares de bases nitrogenadas (PEDROSA *et al.*, 2005). Este genoma apresentou alta similaridade com genomas de outras  $\beta$ -proteobactérias especialmente *Janthinobacterium* sp., *Ralstonia* spp. e *Burkholderia* spp. O banco de dados de sequência e anotação foi disponibilizado para este trabalho pela coordenação do GENOPAR ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)).

O processo de interação planta-bactéria tem sido estudado em mais detalhes em organismos como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*,

*Azorhizobium* e *Allorhizobium* (FRANCO & FARIA, 1997). Estes formam interação simbiótica com plantas leguminosas. A simbiose inicia-se pela formação de nódulos na raiz ou caules em resposta à presença da bactéria (PERRET *et al.*, 2000; VIPREY *et al.*, 1998; HUNGRIA *et al.*, 1994). Em *Rhizobium*, a interação da bactéria com a planta hospedeira se inicia a partir da liberação de compostos químicos pelas raízes. Estes compostos interagem com a parede celular bacteriana e atuam como sinal químico para reconhecimento bactéria-planta (INDGE, 2000). As bactérias penetram no córtex, induzem a formação de nódulos na raiz através da liberação de fatores de nodulação, multiplicam-se e subsequentemente diferenciam-se em bacteróides, produzindo o complexo enzimático da nitrogenase. No interior dos nódulos existe um ambiente com baixa concentração de oxigênio, que permite a atividade da nitrogenase bacteriana, convertendo nitrogênio atmosférico em amônia. Em contrapartida, a planta provê a bactéria com fontes de carbono (BLOEMBERG *et al.*, 2001).

Outras bactérias têm a capacidade de associar-se aos tecidos vegetais sem formarem nódulos. A colonização da planta por estas bactérias inicia-se pela superfície das raízes, normalmente nos pontos de inserção das raízes secundárias e, em seguida, ocupando espaços intercelulares e o aerênquima, ganham o corpo do vegetal localizando-se em raízes, caule e folhas, principalmente nos espaços apoplásticos (GYANESHWAR *et al.*, 2001).

Em *H. seropedicae*, o processo de colonização ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta, seguida por sua proliferação, preferencialmente nos pontos de emergência de raízes secundárias e ferimentos. O espalhamento das bactérias ocorre através dos espaços intercelulares com posterior ocupação do xilema (RONCATO-MACCARI, 2003a).

## 1.2 PROTEOMA

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas que intervêm no processo biológico de uma espécie. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1993 por Mark Wilkins e Keith Williams para descrever o complemento protéico total do genoma (BLACKSTOCK & WEIR, 1999; LOPEZ, 1999). Analisando o proteoma de um organismo é possível obter uma visão de todas as proteínas existentes em seu

fenótipo molecular específico, é altamente dinâmico e dependente do estado da célula (GODOVAC-ZIMMERMANN & BROWN, 2001).

O proteoma não é estático, mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente (KAZMI & KRULL, 2001). Em resposta a estímulos ou diferentes condições de cultivo, as proteínas podem sofrer alterações em seus padrões de expressão, modificação pós-traducional ou localização celular. Um mesmo genoma pode potencialmente originar um número infinito de proteomas, e desta maneira, o proteoma é uma ferramenta que vem complementar o estudo do genoma (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

O sequenciamento completo do genoma de um organismo gera os chamados quadros de leitura aberto ou ORFs (*Open Reading Frames*), que são sequências de bases que tem o potencial de codificar proteínas. Algumas destas ORF's codificam proteínas hipotéticas, que são proteínas que não apresentam ainda uma anotação funcional confiável (CASH, 2002). Aproximadamente 30% das ORF's de organismos já sequenciados codificam para proteínas hipotéticas e, portanto a confirmação de um produto gênico através da análise proteômica é um passo importante complementar à anotação do genoma (PANDEY & MANN, 2000).

O proteoma, como ferramenta que complementa o genoma é muito mais extenso e complicado que o genoma uma vez que o DNA possui somente quatro bases nitrogenadas, e as proteínas estão compostas de 20 tipos de aminoácidos. Desta maneira, existem mais proteínas em um proteoma do que genes em um genoma (KAZMI & KRULL, 2001).

Inúmeras possibilidades de interações entre as proteínas tornam o proteoma ainda mais complexo, uma vez que a função molecular de uma proteína isolada pode não ser a mesma que a função dessa proteína num ambiente celular complexo. A estrutura tridimensional da proteína também vai interferir no papel funcional que desempenha (KAZMI & KRULL, 2001).

Outra ferramenta que complementa o genoma seria o transcriptoma, que leva em consideração os níveis de RNA mensageiro na célula. Esta análise permite verificar os genes que estão sendo transcritos pelo indivíduo em uma determinada condição celular. Porém diversos estudos demonstraram que há baixa correlação entre a abundância de RNAm e a concentração das proteínas correspondentes (OLIVER, 2000). Adicionalmente, apesar dos estudos de RNAm mostrarem a

ocorrência de expressão gênica, estes não fornecem informações a respeito de modificações pós-traducionais (MANN & JENSEN, 2003).

Desta forma, a Proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK & WEIR, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo pode fornecer não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula (BELIZÁRIO, 2000).

Uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo do proteoma é a eletroforese bidimensional (2D), proposta por O'FARREL (1975) e KLOSE (1975). A técnica consiste em duas corridas eletroforéticas sequenciais: primeiro a focalização isoeletrica (IEF) para separar as proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico, e a segunda, a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para separá-las de acordo com suas massas moleculares.

A eletroforese bidimensional é um método de separação proteica que permite separar simultaneamente centenas de proteínas diferentes, de acordo com seu ponto isoeletrico (pI) e massa molecular. Esta ferramenta possibilita a análise de amostras complexas, como extratos celulares, que apresentam uma grande diversidade de proteínas com características moleculares como ponto isoeletrico e massa molecular diferentes (WESTERMEIER & NAVEN, 2004).

Apesar de ser uma técnica amplamente empregada, a eletroforese bidimensional traz algumas limitações. Devido à grande complexidade proteica celular, é impossível analisar todas as proteínas de uma amostra, uma vez que a técnica é sensível para proteínas entre 10-100 kDa de massa molecular. Além disso, proteínas muito ácidas ou básicas, assim como proteínas pouco comuns (menos de 10.000 cópias por célula) ou ainda aquelas pouco solúveis dificilmente são analisadas por esta técnica (WEHR, 2001).

Após a separação das proteínas de uma amostra, estas podem ser identificadas através da espectrometria de massas. Os espectrômetros de massa são instrumentos analíticos que determinam a massa molecular de compostos químicos através da ionização e posterior separação dos íons moleculares de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Os espectrômetros são constituídos por



uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector (WAGNER *et al.*, 2002).

O espectrômetro do tipo MALDI-ToF utiliza MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization ou Ionização induzida a laser e assistida por matriz) como fonte de íons e está acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo, ToF (*Time of Flight*). Este equipamento identifica o tempo de voo de uma série de peptídeos obtidos pela digestão enzimática com sítio de digestão específico, e de acordo com esse tempo é determinada a massa/carga de cada peptídeo. É obtida então a chamada impressão digital de peptídeos (PMF – *Peptide Mass Fingerprint*). A enzima mais utilizada neste tipo de análise é a tripsina, que faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de lisina e arginina se estes não forem precedidos por prolina (SHEVCHENKO *et al.*, 1996; CAGNEY *et al.*, 2003). Utilizando o espectrômetro do tipo MALDI-ToF-ToF é possível determinar a sequência de aminoácidos de um peptídeo (AEBERSOLD & GOODLET, 2001; KÖPKE, 2003).

A utilização do PMF para identificação protéica exige que o genoma do organismo que está sendo estudado esteja armazenado em um banco de dados. Os dados das proteínas digeridas são confrontados com o banco de dados do genoma utilizando programas que usam algoritmos sofisticados, como exemplo “Bayesian” do programa ProFound, “MOWSE modificado” e “Número de matches” no MSFit e “MOWSE baseado em probabilidade” no Mascot. A identificação da proteína depende então da comparação entre as massas obtidas experimentalmente e aquelas obtidas teoricamente (MANN *et al.*, 2001).

Quando não existe o sequenciamento do genoma do organismo de interesse não é possível utilizar a técnica do PMF, tendo em vista que a substituição de apenas um aminoácido leva a uma modificação significativa na massa do peptídeo, impossibilitando sua correta identificação. Uma das ferramentas mais utilizadas neste caso é o MALDI-ToF-ToF. Baseada no sequenciamento de um peptídeo específico clivado com tripsina, é feita uma busca em sequências disponíveis em banco de dados utilizando o modo MS/MS de alguns dos programas para identificação de proteínas como ProFound, MSFit, Mascot (AEBERSOLD & GOODLET, 2001).

Quando a sequência da proteína de interesse não está disponível no banco de dados, alternativamente, pode-se realizar sequenciamento *de novo*, com auxílio

de programas de computador como PepSeq. Deste modo, a partir do espectro MS/MS é possível determinar a estrutura primária do peptídeo selecionado.

Para minimizar algumas limitações da eletroforese bidimensional (2-D PAGE) como identificação de proteínas fora da faixa de 10-100 kDa ou proteínas muito ácidas ou básicas, técnicas de separação alternativas têm sido integradas com detectores de massas (MS) compondo uma nova plataforma para análise do proteoma.

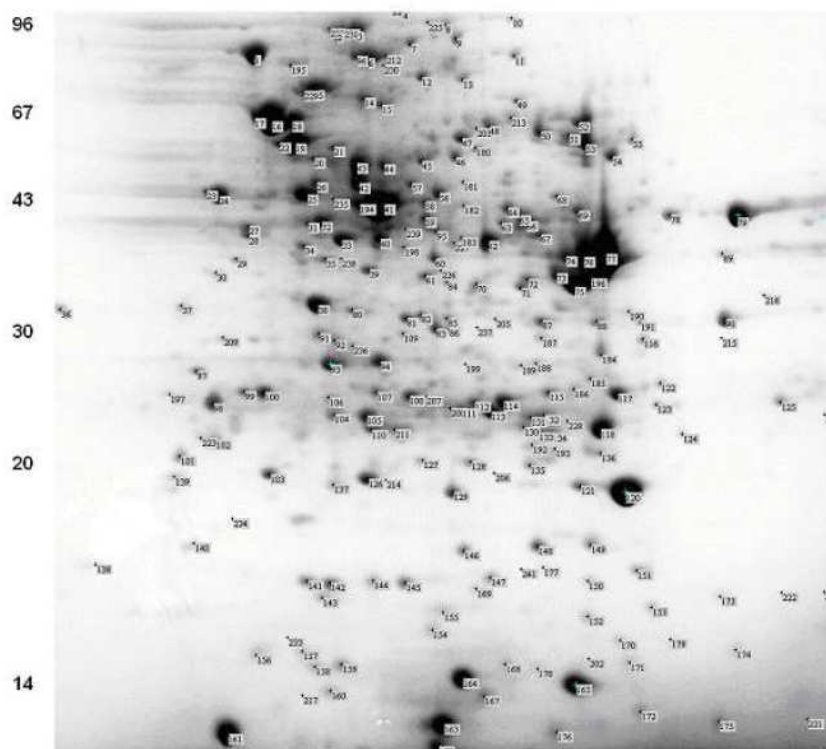
Estas alternativas dependem da habilidade de uma associação entre espectrômetros de massas (tandem MS) para coletar um peptídeo específico, mesmo se numerosos outros peptídeos estiverem simultaneamente presentes na amostra.

Quando as amostras são extremamente complexas, utiliza-se cromatografia líquida em fase reversa, diretamente conectada a um espectrômetro de massas, para concentrar e separar os peptídeos antes do seqüenciamento por MS. O espectrômetro isola o peptídeo de interesse e faz uma fragmentação branda na região das ligações peptídicas produzindo fragmentos que são registrados como um espectro de massas no sistema em sequência (MS/MS). Esta fragmentação permite identificar com precisão a sequência de aminoácidos.

O resultado desse tipo de análise permite que um grande número de peptídeos possam ser individualmente selecionados, isolados e seqüenciados durante uma única análise por LC/MS/MS.

Chaves (2008), utilizando a metodologia de identificação de proteínas baseada em PMF, determinou o mapa de referência para as proteínas expressas em *Herbaspirillum seropedicae* para condição de cultivo com altas concentrações de amônio (20 mM) e a temperatura de 30°C. Este mapa referencial mostra que a maior parte das proteínas expressas encontra-se na faixa de pH 3–10 e com massa molecular entre 10-100 kDa (Figura 1) (Chaves, 2008).

FIGURA 1 – MAPA DE REFERÊNCIA DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE *H. seropedicae*



*H. seropedicae* foi cultivado em meio NFbHP-malato contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) a 30°C. As proteínas foram separadas em um gradiente de pH de 3 a 10 e o gel foi corado com Coomassie Blue coloidal. De 242 bandas protéicas detectadas, 207 foram identificadas (Chaves, 2008).

### 1.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Ritosa (1962) observou que o aumento da temperatura levava a uma mudança no padrão de cromossomos politênicos da glândula salivar de larvas de *Drosophila melanogaster* e também a alteração dos genes expressos. Posteriormente, esses genes expressos diferencialmente devido à variação de temperatura foram clonados e seus produtos protéicos chamados de proteínas de choque térmico (HSP) (TISSIÈRS *et al.*, 1974). Esta resposta ao estresse descrita para larvas de *D. melanogaster* é aparentemente universal, ocorrendo tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos (WUNDERLICH *et al.*, 2003). O estresse oxidativo, a exposição celular a metais pesados e situações patológicas como isquemia, reperfusão, inflamação e lesão tecidual, estímulos fisiológicos como fatores de crescimento e estímulos hormonais são fatores que estão também associados à expressão de proteínas de choque térmico (ASEA *et al.*, 2000).

Uma família de proteínas importante nesta resposta ao estresse é o grupo das chaperonas moleculares, proteínas que interagem com diversos substratos protéicos para auxiliar na obtenção da conformação tridimensional adequada ou no encaminhamento destas proteínas para degradação (JOLLY & MORIMOTO, 2000). Consequentemente, as proteínas de choque térmico auxiliam na recuperação celular após o estresse reparando proteínas mal-formadas ou então promovendo sua degradação. Normalmente localizadas no retículo endoplasmático das células, as proteínas chaperonas podem também estar localizadas nos outros compartimentos celulares nos quais as proteínas adquirem a conformação final, como núcleo, mitocôndrias e membrana plasmática (MELNICK & ARGON, 1995). Este grupo de proteínas é classificado de acordo com a massa molecular que apresentam, algumas delas listadas na Tabela 1.

Apesar de serem denominadas proteínas de choque térmico, muitas são expressas também em condição normal. Por esse motivo, muitas chaperonas são classificadas atualmente como HSP, pois seguem a nomenclatura passada. Um exemplo seria a HSP 70 (DnaK), uma das chaperonas com maior expressão nas células, tanto em condições normais como sob estresse (WANG *et al.*, 2004).

TABELA 1. PROTEÍNAS INDUZIDAS PELO CHOQUE TÉRMICO EM PROCARIOTOS

<b>Massa molecular aproximada (kDa)</b>	<b>Proteína (referência)</b>
10 kDa (Hsp 10)	GroES (FAYET <i>et al.</i> , 1989), IpbA, IpbB (ALLEN <i>et al.</i> , 1992)
20-30 kDa (Hsp 27)	GrpE (HARTL & MARTIN, 1995), Hsp 31 (QUIGLEY <i>et al.</i> , 2004)
40 kDa (Hsp 40)	DnaJ (HARTL & MARTIN, 1995)
60 kDa (Hsp 60)	GroEL (FAYET <i>et al.</i> , 1989)
70 kDa (Hsp 70)	DnaK (MACARIO & MACARIO, 1999)
90 kDa (Hsp 90)	HtpG (SCHULZ <i>et al.</i> , 1997)
100 kDa (Hsp 100)	ClpB (KONIECZNY & LIBEREK, 2002)

Em *Escherichia coli*, a resposta ao choque térmico e a expressão de HSP são positivamente reguladas por fatores de transcrição incluindo o fator  $\sigma^{32}$  da RNA polimerase, codificado pelo gene *rpoH* (BUKAU 1993; YURA *et al.*, 1993; GROSS 1996; MORIMOTO *et al.*, 1996). Porém, a expressão dos genes também pode ser regulada negativamente em resposta ao choque térmico (NARBERHAUS, 1999; RON

*et al.* 1998). Um exemplo é o gene *hrcA* que codifica um repressor do gene *groEL* em *Bacillus subtilis*. A Tabela 2 mostra sistemas de controle positivo e negativo dos genes relacionados com a resposta ao choque térmico em diversos organismos.

A classe de HSP melhor estudada é a HSP 70, constituída de proteínas normalmente presentes em baixas concentrações na célula, mas cuja expressão é aumentada durante o choque térmico. Suas funções são auxiliar a montagem e hidrólise de proteínas, prevenir a agregação dos polipeptídios, ajudar na translocação de proteínas entre os compartimentos celulares e evitar a formação de grandes complexos protéicos (GETHING, 1997).

Em *E. coli*, a principal proteína de choque térmico da família das HSP 70 é a DnaK. O gene *dnaK* (*hsp70*) é expresso em condições normais de crescimento e seu produto é a chaperona DnaK (Hsp70). A sequência de aminoácidos da proteína DnaK é altamente conservada em bactérias, como em *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sakei*, *Streptomyces coelicolor* e espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Bacillus* e *Streptococcus* (GUPTA & SINGH, 1994; RENSING & MAIER, 1994; GUPTA, 1998). De fato, esta chaperona é considerada uma das proteínas mais conservadas (MACARIO & MACARIO, 1999).

A atividade de DnaK está intimamente relacionada com a dependência de ligação com ATP, que fornece energia para que esta chaperona se ligue a proteínas para ajudar na montagem, reparo ou degradação de proteínas recém montadas ou desnaturadas. Além disso, para que a DnaK se ligue às proteínas, é necessária a participação de co-chaperonas: Hsp40 (DnaJ) e GrpE (HARTL & MARTIN, 1995; MAYER & BUKAU, 1998). Estas três proteínas constituem a maquinaria necessária para auxiliar outras proteínas a adquirir sua conformação nativa (GEORGOPOULOS & WELCH, 1993; PARSELL & LINDQUIST, 1993; GLOVER & LINDQUIST, 1998; KEDZIERSKA *et al.*, 1999).

TABELA 2. SISTEMAS DE CONTROLE DE EXPRESSÃO INDUZIDA POR CHOQUE TÉRMICO EM BACTÉRIAS

MECANISMO	ORGANISMO	GENES OU OPERONS REGULADOS
<b>Controle positivo</b>		
$\sigma^{32}$ (RpoH)	<i>Escherichia coli</i>	<i>dnaKJ</i> , <i>grpE</i> , <i>groESL</i> e outros
$\sigma^E$ ( $\sigma^{24}$ RpoE)	<i>Escherichia coli</i>	<i>htrA</i> , <i>rpoH</i> , operon <i>rpoE</i> e outros
$\sigma^B$ (SigB)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>gspA</i> , <i>csbA</i> , <i>katE</i> e mais (classe II) <sup>a</sup>
$\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ RpoN)+PspF	<i>Escherichia coli</i>	<i>pspABCDE</i>
<b>Controle negativo</b>		
CIRCE/HrcA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>groESL</i> , operon <i>dnaK</i> (classe I) <sup>a</sup>
HAIR/HspR	<i>Streptomyces albus</i>	operon <i>dnaK</i> , <i>clpB</i>
OrfY	<i>Streptomyces albus</i>	<i>hsp18</i>
ROSE	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>hspArpoH<sub>1</sub></i> e mais
CtsR	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>clpC</i> , <i>clpP</i> e mais (classe III) <sup>a</sup>
desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>htpG</i> , <i>ftsH</i> , <i>lon</i> e mais classe IV) <sup>a</sup>
desconhecido	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>hsp18</i>
desconhecido	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>hsp18</i>

a. Classificação revisada das proteínas de choque térmico de *B. subtilis*, proposta por Hecker et al

1996. FONTE: NARBERHAUS, 1999.

A expressão do gene *rpoH* é determinada pelo balanço homeostático entre a ligação da DnaK com proteínas desnaturadas e da interação da DnaK com o fator  $\sigma^{32}$  (GAMER *et al.*, 1992). Quando as células encontram-se em condições normais, a concentração de proteínas desnaturadas é reduzida e a chaperona DnaK livre se ligar ao fator  $\sigma^{32}$ , reduzindo a transcrição dos genes de proteínas de choque térmico (HERMAN *et al.*, 1995). Sob condições de choque térmico, a DnaK liga-se preferencialmente com proteínas desnaturadas, e desta forma o fator  $\sigma^{32}$  fica livre para se ligar à RNA polimerase, e este complexo fator  $\sigma^{32}$ /RNA polimerase induz a transcrição específica de genes de choque térmico, incluindo os genes *dnaK* e *rpoH*.

Algumas proteínas necessitam de outra chaperona, GroEL, para o processo de renaturação ser completado, como está mostrado na Figura 2. A proteína GroEL também é uma HSP cuja expressão é controlada pelo fator  $\sigma^{32}$ . Assim como DnaK,

GroEL é altamente conservada, ATP-dependente, e possui atividade de chaperona ligando-se a proteínas em estado não-nativo e auxiliando a recuperação de suas formas nativas (SEKIGUCHI *et al.*, 2003). GroEL e sua co-chaperona GroES são proteínas essenciais não somente em condições de estresse, mas também sob condições normais (FAYET *et al.*, 1989). Em *E. coli*, estas duas proteínas são co-expressas a partir do operon *groESL* (GEORGOPOULOS *et al.*, 1973; SUNDARAM *et al.*, 1998). Na presença de íons  $Mg^{+2}$  e ATP, as proteínas GroEL e GroES interagem com muitas proteínas nascentes e recém-sintetizadas que ainda não adquiriram sua conformação original (EWALT *et al.*, 1997) e catalisam o processo de enovelamento para a obtenção da forma nativa funcional. Alguns autores propuseram que os substratos fisiológicos de GroEL são proteínas estruturalmente instáveis que portanto requerem a chaperona permanentemente para manutenção conformacional (HOURY *et al.*, 1999).

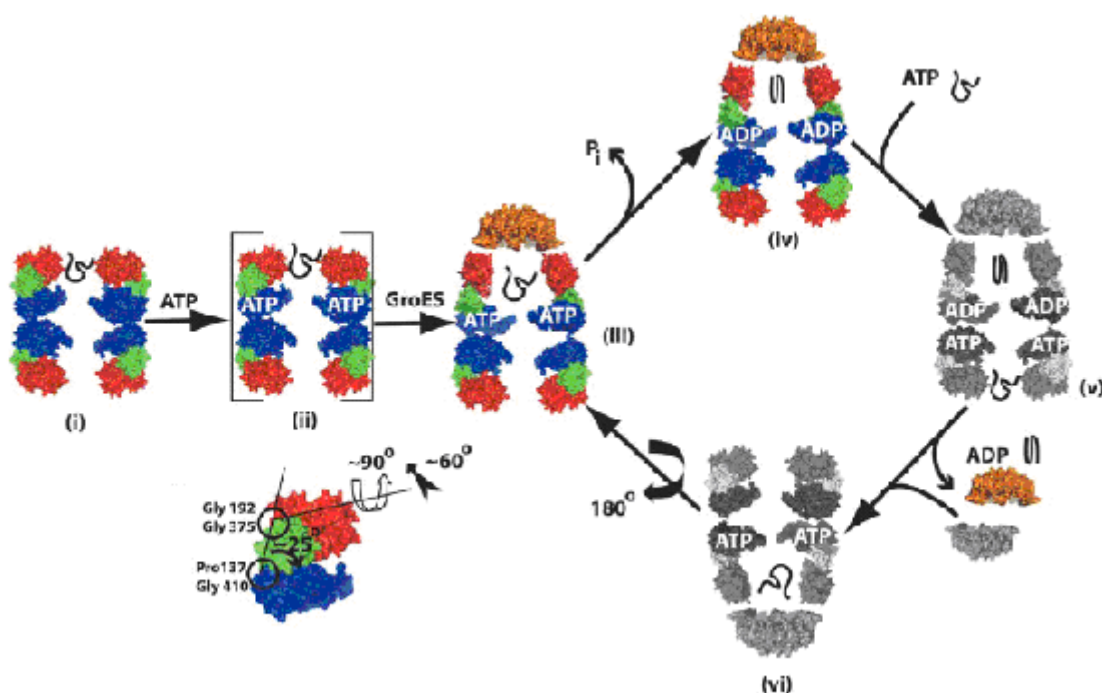
A estrutura quaternária das proteínas GroEL e GroES é crucial para suas funções de chaperona e co-chaperona. GroES é um anel rotacionalmente simétrico de 7 subunidades idênticas com massa molecular de 10 kDa cada, que formam uma estrutura em forma de cúpula. GroEL é um tetradecâmero de unidades idênticas de 57 kDa dispostas em 2 anéis de 7 subunidades justapostas, formando as paredes de formato cilíndrico (HUNT *et al.*, 1996).

Cada monômero da chaperona GroEL possui três domínios distintos: um domínio apical que forma a entrada para o canal central e possui um sítio para ligação do peptídeo; um domínio equatorial rico em hélices que possui um sítio para ligação de ATP (pode ligar em três resíduos de cisteínas: Cys<sup>138</sup>, Cys<sup>458</sup>, e Cys<sup>519</sup>); e um domínio intermediário em forma de dobradiça que liga os domínios apical e equatorial. A GroEL se associa com a GroES na presença de um polipeptídeo em conformação não-nativa e 7 moléculas de ATP (HUNT *et al.*, 1996).

O mecanismo de renaturação catalisada por GroEL-GroES tem sido bastante estudado e possui uma numerosa sequência de reações (XU *et al.*, 1997; MOTOJIMA *et al.*, 2004). Para que um polipeptídeo desnaturado recomponha sua estrutura tridimensional adequada, ele liga-se no domínio apical da GroEL. Em seguida, sete moléculas de ATP e uma GroES ligam-se na GroEL, estabilizando a ligação com o polipeptídeo ligado ao domínio equatorial da GroEL e formando uma estrutura chamada “gaiola de Anfinsen”. Posteriormente ocorre a hidrólise do ATP e

a liberação do ADP, da GroES e do polipeptídeo renaturado. Na Figura 3 está esquematizado o processo de funcionamento da GroEL/GroES em *E. coli*.

FIGURA 2 – MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DO COMPLEXO GROEL/GROES EM *Escherichia coli*



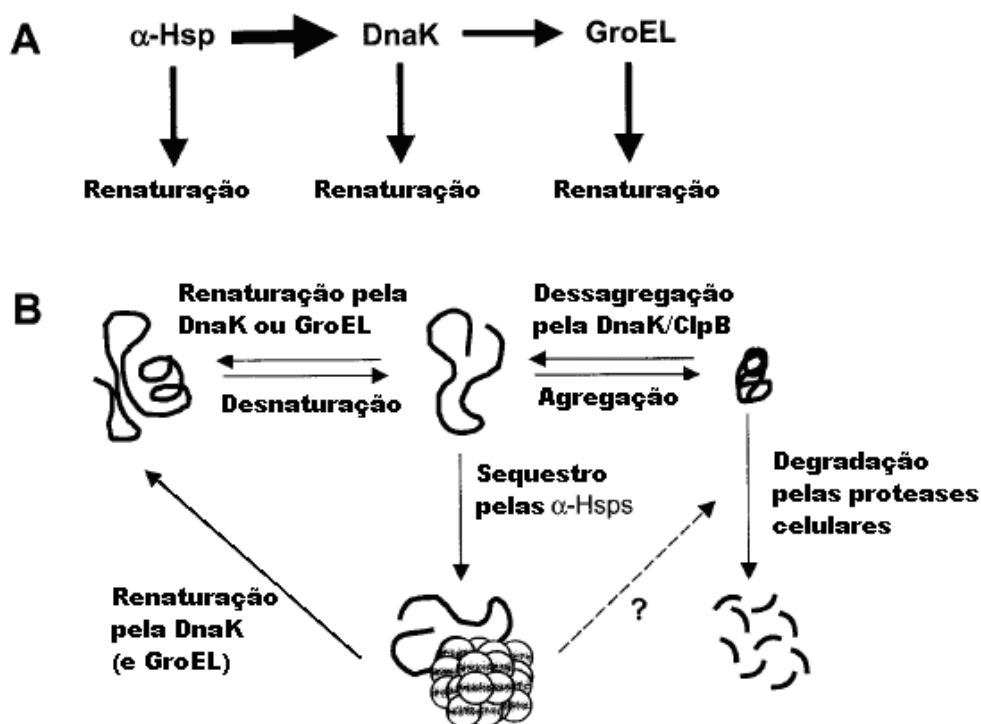
(i) Ligação do polipeptídeo na sua conformação não-nativa na região superior da GroEL (cis) [polipeptídeo em preto ligado na região apical vermelha]; (ii) ligação do ATP, enfraquecimento na interação do polipeptídeo com o domínio apical e mudança de conformação da GroEL [região em azul] para permitir a ligação da GroES [estrutura alaranjada]; (iii) ligação da GroES e mudança conformacional da GroEL para aumentar seu volume e formar a “Gaiola de Anfinsen”; (iv) hidrólise do ATP para que o polipeptídeo adquira sua conformação nativa; (v) liberação do ADP, do polipeptídeo na conformação nativa e da GroES; (vi) novo ciclo mas com ligação do polipeptídeo, ATP e GroES na região inferior (trans). (HUNT *et al.*, 1996).

Outro grupo de HSPs induzidas por choque térmico inclui proteínas de baixa massa molecular (aproximadamente 10 KDa), também denominadas  $\alpha$ -HSPs. Os membros deste grupo são capazes de se associar com proteínas, impedindo sua agregação irreversível e sua desnaturação. Em *E. coli* foram descritas 2  $\alpha$ -HSPs desta família, IpbA e IpbB (KUCZYNSKA *et al.*, 2002). A expressão de ambas as proteínas é induzida positivamente pelo fator  $\sigma^{32}$  em *E.coli* (BUKAU, 1993; YURA *et al.*, 1993; GROSS, 1996; MORIMOTO *et al.*, 1996). A indução da expressão destas



$\alpha$ -HSPs ocorre em células que foram cultivadas a 30°C e posteriormente submetidas a 45°C durante 15 min (KUCHARCZYK *et al.*, 1991; LASKOWSKA *et al.*, 1996).

FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA RENATURAÇÃO PROTÉICA



A, Relação entre  $\alpha$ -Hsp, DnaK e GroEL; B, Relação funcional entre as proteínas de choque térmico e a proteína desnaturada (NARBERHAUS, 2002).

A proteína IbpA (16kDa) tem como função impedir a inativação de muitas enzimas pelo calor, incluindo a citrato sintase e a 6-fosfogluconato desidrogenase (KITAGAWA *et al.*, 2002). A IbpB (16 KDa) se liga com a IbpA para formar um "corpo de inclusão". Esta estrutura é formada rapidamente no citoplasma da célula quando a concentração de proteínas em conformação não-nativa aumenta. Este acúmulo é responsável pela indução da transcrição de IbpA e IbpB que se aderem às proteínas não-nativas formando o corpo de inclusão e direcionando algumas destas proteínas para as chaperonas DnaK e GroEL (Figura 2) (ALLEN *et al.*, 1992; NARBERHAUS, 2002).

Análises por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) de agregados protéicos mostraram que IbpA e IbpB em *E. coli* são as proteínas mais abundantes na fração insolúvel, embora a concentração de IbpB seja menor que a de IbpA (KUCZYNSKA

*et al.*, 2002). Isto sugere que ambas as proteínas atuam em conjunto na estabilização dos agregados protéicos pós-choque térmico. É interessante notar que proteínas chaperonas ATP-dependentes (DnaK/DnaJ, GroEL/GroES) previnem a formação de agregados protéicos em *E. coli* (KEDZIERSKA *et al.*, 1999), enquanto que IbpA e IbpB, ambas proteínas não-dependentes de ATP, exercem um efeito oposto. Outro fator importante é que depois de uma mudança de temperatura de 30°C para 42°C, o nível celular de IbpA e IbpB em *E. coli* aumenta aproximadamente 10 vezes, enquanto que a concentração de DnaK e GroEL apenas 2 vezes (MOGK *et al.*, 1999).

Várias modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, desamidação, acetilação e glicosilação, tem sido descritas para as  $\alpha$ -HSPs em mamíferos. A fosforilação de um ou mais resíduos de serina ocorre em diferentes tecidos ou células em resposta a estímulos como calor, metais pesados e fatores de crescimento. Este fenômeno está normalmente relacionado com mudanças na estrutura do complexo protéico formado pós-estresse (NARBERHAUS, 2002).

A HSP 31 foi encontrada em *E. coli* quando a cultura a 23°C foi submetida a 45°C por 30 minutos. Esta proteína aparentemente tem atividade de chaperona, prevenindo a desnaturação de proteínas criando ao redor uma camada hidrofóbica durante a elevação da temperatura (QUIGLEY *et al.*, 2003).

A proteína UspA, proteína de estresse universal, é outra pequena proteína citoplasmática identificada em trabalhos anteriores (NYSTRÖM & NEIDHARDT, 1994; SILVEIRA, 2005). Esta proteína é codificada pelo gene *uspA* cuja expressão é aumentada quando a viabilidade celular é alterada devido a vários agentes de estresse, seja choque térmico, falta de nutrientes ou agentes tóxicos. Além disso, em *E. coli* a inativação do gene *uspA* torna a bactéria mais sensível aos agentes estressantes (NYSTRÖM & NEIDHARDT, 1994; DIEZ *et al.*, 2000). Bochkareva e colaboradores (2002) notaram que UspA foi co-sedimentada com GroEL durante o processo de purificação. Após adição de ATP e GroES, UspA foi liberada demonstrando que existe interação entre GroEL e UspA.

A fasina, produto do gene *phaP*, faz parte de uma classe de proteínas que ligam na superfície de PHA (poli-hidroxi-alcanoato), estabilizando o PHA no citoplasma da célula, evitando a formação de grânulos. PHA consiste em um poli-tioéster sintetizado pela poli-hidroxi-alcanoato sintase. Esta enzima encontra-se expressa em níveis relativamente altos (5% do total de proteína) em *R. eutropha*

durante a produção de PHB (poli-hidroxi-butirato) sob baixa concentração de nitrogênio (WIECZOREK *et al.*, 1996).

Em *Corynebacterium glutamicum*, Barreiro e colaboradores (2005) identificaram o aumento da expressão de algumas proteínas de choque térmico, como DnaK, GroEL, GrpE, PPIase, ClpB e PoxB após 60 minutos de cultivo a 40°C.

Em *H. seropedicae* foram identificadas algumas proteínas relacionadas ao choque térmico após exposição das células a 42°C durante 15 minutos. DnaK e GroEL tiveram sua expressão aumentada na condição de estresse térmico. A co-chaperona GroES, 3 isoformas de IbpA e 2 isoformas de UspA foram identificadas apenas na condição de estresse térmico, enquanto que a proteína fasina foi encontrada em maior concentração na condição de choque térmico (SILVEIRA, 2005). Em relação às isoformas de IbpA, foram identificados três diferentes pontos protéicos, sendo que dois destes representam proteínas de mesma massa molecular, porém a terceira banda apresenta uma massa menor. Esses dados sugerem que ocorrem mudanças pós-traducionais em IbpA. Também foram encontradas duas isoformas de UspA com pI diferentes. O deslocamento do pI teórico de 6,27 para 5,98 nas isoformas de UspA sugere a presença de uma isoforma fosforilada (SILVEIRA, 2005).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi identificar proteínas relacionadas ao choque térmico em *H. seropedicae* após 30 minutos de exposição à 42°C.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar qualitativamente e quantitativamente as proteínas diferencialmente expressas após o choque térmico por eletroforese bidimensional;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As células de *H. seropedicae* estirpe SmR1 foram cultivadas em meio NFbHPN-malato (KLASSEN *et al.* 1997) como descrito abaixo.

Composição do meio	Quantidade
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g/L
Ácido nitrilo-triacético	0,056 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
Biotina	1 x 10 <sup>-4</sup> g/L
Malato de potássio	5 g/L
Solução de oligoelementos	10 mL/L

Composição da solução de oligoelementos:	Quantidade
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-3</sup> g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,35 x 10 <sup>-3</sup> g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 x 10 <sup>-3</sup> g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8,0 x 10 <sup>-3</sup> g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4 x 10 <sup>-3</sup> g/L
Água destilada q.s.p	950 mL

A solução de fosfatos e o meio malato foram esterilizados separadamente. No momento do uso foram adicionados a 950 mL meio 50 mL solução de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,8 g e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 59,5 g), a fonte de nitrogênio NH<sub>4</sub>Cl (20 mM) e o antibiótico estreptomicina (80 µg/mL). O meio completo foi denominado NFbHPN-malato.

As células foram cultivadas em 25 mL de meio NFbHPN contidos em cada um de 6 frascos erlenmeyer de 125 mL, em agitação constante de 120 rpm em banho de água a 30°C, durante aproximadamente 15 horas. Após o crescimento foi determinada uma D.O. (densidade ótica) em 600 nm em espectrofotômetro de aproximadamente 1,0.

### 3.2 CHOQUE TÉRMICO

As células de *H. seropedicae* contidas em 3 frascos erlenmeyer foram mantidas a 30°C e os outros 3 frascos foram incubados em banho Maria previamente ajustado a 42°C. Para análise em eletroforese unidimensional, amostras de 1 mL foram coletadas após 0, 15, 30, 45 e 60 minutos de exposição à temperatura de 30°C e 42°C, e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. Após descongelamento em temperatura ambiente as células foram lavadas e ressuspensas em tampão contendo Tris-HCl pH 8,0 (50 mM), NaCl (200 mM), glicerol (10%) e armazenadas no freezer -70°C até o momento do uso.

Para a análise em eletroforese bidimensional, as células de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C até atingirem a D.O.<sub>600</sub> aproximadamente 1,0. Em seguida um dos frascos inoculado foi transferido para um banho a 42°C e o outro mantido como condição controle, durante 30 minutos, com agitação 120 rpm. Após o tempo de choque térmico as células foram resfriadas em nitrogênio líquido para a paralisação imediata do metabolismo. Em seguida, as culturas foram centrifugadas 2 vezes a 5.000 x g por 15 min a 4°C e as células ressuspensas em tampão contendo Tris-HCl pH 8,0 (50 mM), NaCl (200 mM), glicerol (10%) e armazenadas no freezer -70°C com inibidor de protease PMSF ou fluoreto de fenil-metil-sulfonilo (0,5mM).

### 3.3 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL

Para a determinação da concentração das proteínas amostras foram tratadas com 100 mL de NaOH 1M por 30 minutos e 100 µL foram utilizados para dosagem através do método descrito por Bradford (1976). Para eletroforese unidimensional, foram aplicados o equivalente a 40 µg de cada amostra misturados com tampão de amostra (Tris-HCl 12 mM pH 6,8, glicerol 5%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mM e azul de bromofenol 0,02%) em um volume total de 40 µL. A mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O gel de separação continha acrilamida 11% (acrilamida 20:1 bis-acrilamida), em tampão Tris-HCl 375 mM pH 8,8 e SDS 0,3%. O gel de empilhamento continha poliacrilamida 6%, Tris-HCl 167 mM pH 6,8 e SDS 0,24%.

As corridas foram realizadas em cuba de eletroforese SE 600 Ruby (Hoefer) com sistema de controle de temperatura ajustado para 15 °C em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 0,1% SDS, pH 8,3). A duração da corrida eletroforética foi de 5 h sob tensão de 100 volts e corrente de 35 mA.

Após a eletroforese, o gel foi corado pelo método Coomassie Blue coloidal (WESTERMEIER & NAVEN, 1993). As proteínas foram fixadas durante 60 minutos com uma solução contendo ácido orto-fosfórico 1,3% e metanol 20%. Após a fixação das proteínas, o gel foi corado durante aproximadamente 12 horas com ácido orto-fosfórico 1,5%, sulfato de amônio 7,7% e Coomassie Blue G-250 0,01%. Em seguida, o gel foi tratado com uma solução de neutralização por 3 minutos (0,1 M Tris-base com pH ajustado para 6,5 com ácido orto-fosfórico), lavado por 1 minuto com metanol 25% e estabilizado com uma solução de sulfato de amônio 20%.

### 3.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

200 µL de células de *H. seropedicae* ressuspensas em tampão contendo Tris-HCl pH 8,0 (50 mM), NaCl (200 mM), glicerol (10%), foram misturadas com 500 µL de tampão de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% (p/v)CHAPS, 2% IPG Buffer, 1% (p/v) DTT) e rompidas através de sonicação em um Ultrasonic Processor XL (Heat Systems), em banho de gelo. Após a sonicação, o extrato foi centrifugado por 2 min a 12000 g em centrífuga *mini spin* (Eppendorf). A concentração de proteína na solução sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão. Em seguida, 250 µL da solução sobrenadante foram misturados a 90 µL de tampão de reidratação (8 M urea, 0,5% CHAPS, 15 mM DTT, 0,2% IPG Buffer pH 3-10 e traços de azul de bromofenol) (GÖRG *et al.*, 2002).

Alíquotas de 250 µL dessa mistura, equivalente a 600 µg de proteína, foram aplicadas em suportes de cerâmica (GE Healthcare) para a isoeletrofocalização. Sobre o extrato foi colocada uma tira IPG 13 cm (GE Healthcare) com um gradiente linear imobilizado de pH 3 a 10, que foi coberta com 800 µL de óleo mineral. O suporte foi colocado no isoeletrofocalizador IPGphor (GE Healthcare). O tempo de reidratação do gel foi de 12 horas a 20°C e a isoeletrofocalização foi feita posteriormente em 4 etapas: primeira de 500 V (500 Vhr), a segunda de 1000 V (8000 Vhr), a terceira de 8000 V (11300Vhr) e a quarta de 8000 V (7000 Vhr), totalizando 26800 Vhr. Após a isoeletrofocalização, a tira foi colocada em um tubo

de ensaio e equilibrada durante 15 minutos com 5 mL de tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e traços de azul de bromofenol) contendo 50 mg de DTT e, em seguida, por mais 15 minutos em 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 200 mg de iodoacetamida.

A segunda dimensão foi realizada em gel desnaturante 15% (acrilamida 20:1 bis-acrilamida) em cuba de eletroforese SE 600 Ruby (Hoefer) com sistema de controle de temperatura ajustado para 18°C em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 0,1% SDS, pH 8,3). As condições de eletroforese foram 270V, amperagem limitada a 45 mA por gel e com potência máxima de 30W.

Após a eletroforese, o gel foi corado pelo método Comassie Blue coloidal (WESTERMEIER & NAVEN, 2004). As proteínas foram fixadas durante 60 minutos com uma solução contendo ácido orto-fosfórico 1,3% e metanol 20%. Após a fixação das proteínas, o gel foi corado durante aproximadamente 12 horas com ácido orto-fosfórico 1,5%, sulfato de amônio 7,7% e Comassie G-250 0,01%. Em seguida, o gel foi tratado com uma solução de neutralização por 3 minutos (0,1 M Tris-base com pH ajustado para 6,5 com ácido orto-fosfórico), lavado por 1 min com metanol 25% e estabilizado com uma solução de sulfato de amônio 20%.

Após o tratamento, a imagem do gel foi registrada utilizando uma câmera CCD Biochemi (UVP Bioimaging Systems) e analisada com o programa ImageMaster 2D Platinum v.6.0 (GE Healthcare). Este programa permite visualizar os pontos protéicos e avaliar os dados para determinar variação quantitativa (% do volume) e qualitativa dos pontos protéicos, além de determinar a massa molecular e ponto isoelétrico. A massa molecular foi calculada utilizando marcadores com massa molecular conhecida entre 14 e 96 kDa (GE Healthcare).

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

#### 3.5.1 Preparação das Amostras

As proteínas foram retiradas do gel com o auxílio de uma ponteira plástica e colocadas em tubos plásticos de 2 mL. Os fragmentos do gel foram submetidos a um tratamento de descoloração com solução de bicarbonato de amônio (25 mM)/ 50% acetonitrila pH 8,0. A solução foi agitada em vórtex e deixada em repouso durante



10 minutos. A solução foi descartada e a operação repetida até que o gel estivesse completamente descorado (duas ou três vezes). Em seguida, os fragmentos do gel foram desidratados por três tratamentos sucessivos com 50 µL de acetonitrila 100% por 10 minutos, e em seguida, secados a vácuo por 25 minutos a 30°C (WESTERMEIER & NAVEN, 2004).

A reidratação do gel foi realizada com 10 µL de solução de tripsina (10 µg/mL de tripsina em tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, acetonitrila 10%) por 30 minutos a 4°C. Em seguida a solução foi incubada em estufa a 37°C por um período de 14 a 16 horas para a digestão protéica completa. Os peptídeos formados foram extraídos pela adição de 30 µL de solução de extração (acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 5%) com posterior agitação em vortex durante 30 min. A solução sobrenadante foi retirada e este processo repetido mais 2 vezes. As soluções sobrenadantes foram reunidas em tubo plástico de 0,5 mL e a solução de peptídeos extraída foi concentrada a vácuo até aproximadamente 10 µL.

Os peptídeos de cada amostra foram purificados utilizando uma ponteira com uma mini-coluna de fase reversa “PerfectPure C-18 Tip” (Eppendorf). A resina foi pré-hidratada duas vezes com 10 µL de acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 0,1% e equilibrada duas vezes com 10 µL de ácido trifluoroacético 0,1%. Em seguida, a solução de peptídeos foi aspirada e expelida por pelo menos cinco vezes, para a adsorção dos peptídeos à resina de C-18. A ponteira foi então lavada por duas vezes com TFA 0,1% para retirar os contaminantes da amostra. Os peptídeos foram eluídos da coluna em 2 µL de solução acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 0,1% saturada com matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) (Sigma), pela sucção da solução por pelo menos três vezes. A solução com os peptídeos foi dispensada diretamente em uma placa adequada à espectrometria de massa (MTP 384 massive MS target T - Bruker Daltonics), onde os peptídeos foram cristalizados junto com a matriz pela evaporação da solução.

### 3.5.2 Espectrometria de Massas

Para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi utilizado um espectrômetro de massas tipo Maldi-Tof/Tof “Autoflex” (Bruker Daltonics) e o programa FlexControl. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, substância P, bombesina, ACTH e

somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes.

A análise dos espectros de peptídeos obtidos foi realizada através do programa Flex Analysis versão 3.0 (Bruker Daltonics). Os programas “Protein Prospector” versão 3.2.1, instalado localmente, e Mascot foram utilizados para identificação de proteínas a partir das massas moleculares dos peptídeos trípticos obtidos por comparação com as massas moleculares de peptídeos das prováveis proteínas deduzidas da sequência genômica de *Herbaspirillum seropedicae* geradas *in silico*. Os parâmetros de busca utilizados foram os seguintes: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. A tolerância máxima permitida foi de 300 ppm. O resultado da comparação dos peptídeos é uma lista das proteínas candidatas (dadas pelos números das ORFs correspondentes anotadas no genoma) classificadas em ordem decrescente de significância. Os parâmetros utilizados para confirmar ou excluir as proteínas candidatas foram: algoritmo mowse score (Mascot) de uma proteína pelo menos 100 X maior do que a da segunda proteína candidata, cobertura de no mínimo 15% e a comparação entre os valores experimentais e teóricos de pI e massa molecular.

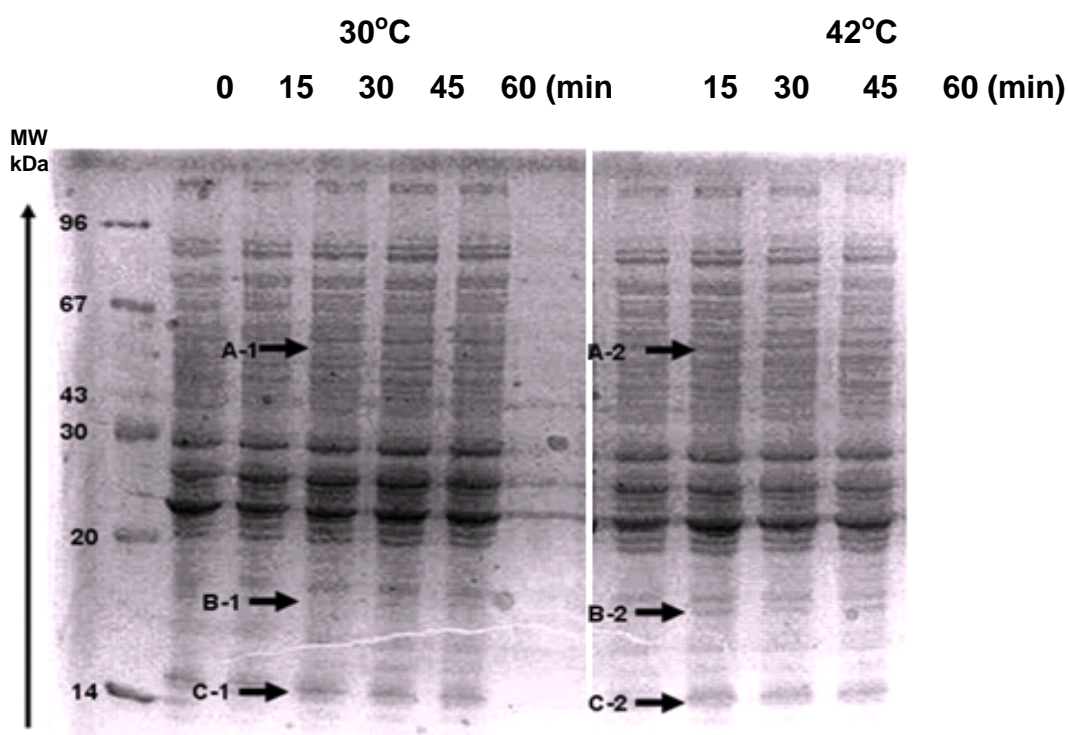
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 O PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE *Herbaspirillum seropedicae* É MODIFICADO APÓS CHOQUE TÉRMICO

A indução da expressão de proteínas em *H. seropedicae* após choque térmico foi avaliada por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE). As amostras obtidas após 0, 15, 30, 45 e 60 minutos de exposição a 42°C foram aplicadas em gel 11% e coradas com Coomassie Blue Coloidal. Os extratos obtidos a partir de 30 minutos de exposição apresentaram um padrão de bandas modificado (Figura 4). Foram identificadas três bandas diferenciais nas amostras obtidas a partir de 30 minutos de exposição a 42°C. A primeira, denominada de A, apresenta massa molecular aproximada de 50 kDa. Esta banda foi observada na condição controle (A-1) e em maior concentração na condição de choque térmico (A-2). A banda denominada B, (massa molecular aproximada de 18 kDa) encontra-se apenas na condição de choque térmico (B-2), não sendo encontrada na região referente a condição controle (B-1). Uma terceira banda (C), com massa molecular aproximada de 14 kDa, apresentou maior intensidade na condição de choque térmico (C-1 e C-2). Estes resultados sugerem que a composição protéica das células de *H. seropedicae* foi modificada após o choque térmico de 30 minutos.

Algumas alterações na expressão protéica de *H. seropedicae* já tinham sido identificadas após exposição a 42°C durante 15 minutos (SILVEIRA, 2005). No entanto, diferentes períodos de exposição a altas temperaturas podem produzir diferentes respostas ao choque térmico. Em *E. coli*, as pequenas proteínas de choque térmico lbpA e lbpB apresentam expressão induzida após choque térmico de 45°C por 15, 30 e 45 minutos de exposição (KUCZYNISKA *et al*, 2002). Já em *Streptococcus pyogenes*, DnaK e GroEL são induzidas após choque térmico de 42°C por 5 minutos, e após 30 minutos a expressão retorna a níveis basais (LAPORT *et al*, 2001).

FIGURA 4 – PADRÃO DE RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO DE *Herbaspirillum seropedicae* REPRESENTADO EM ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL



Eletroforese unidimensional SDS-PAGE 11% de proteínas obtidas de células de *H. seropedicae* nos diferentes tempos (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) nas condições controle a 30°C e choque térmico a 42°C. Os géis foram corados com coomassie blue coloidal. As letras A, B e C representam as bandas diferenciais observadas entre as duas condições de cultivo após 30 minutos.

#### 4.2 ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DE CELULAS DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

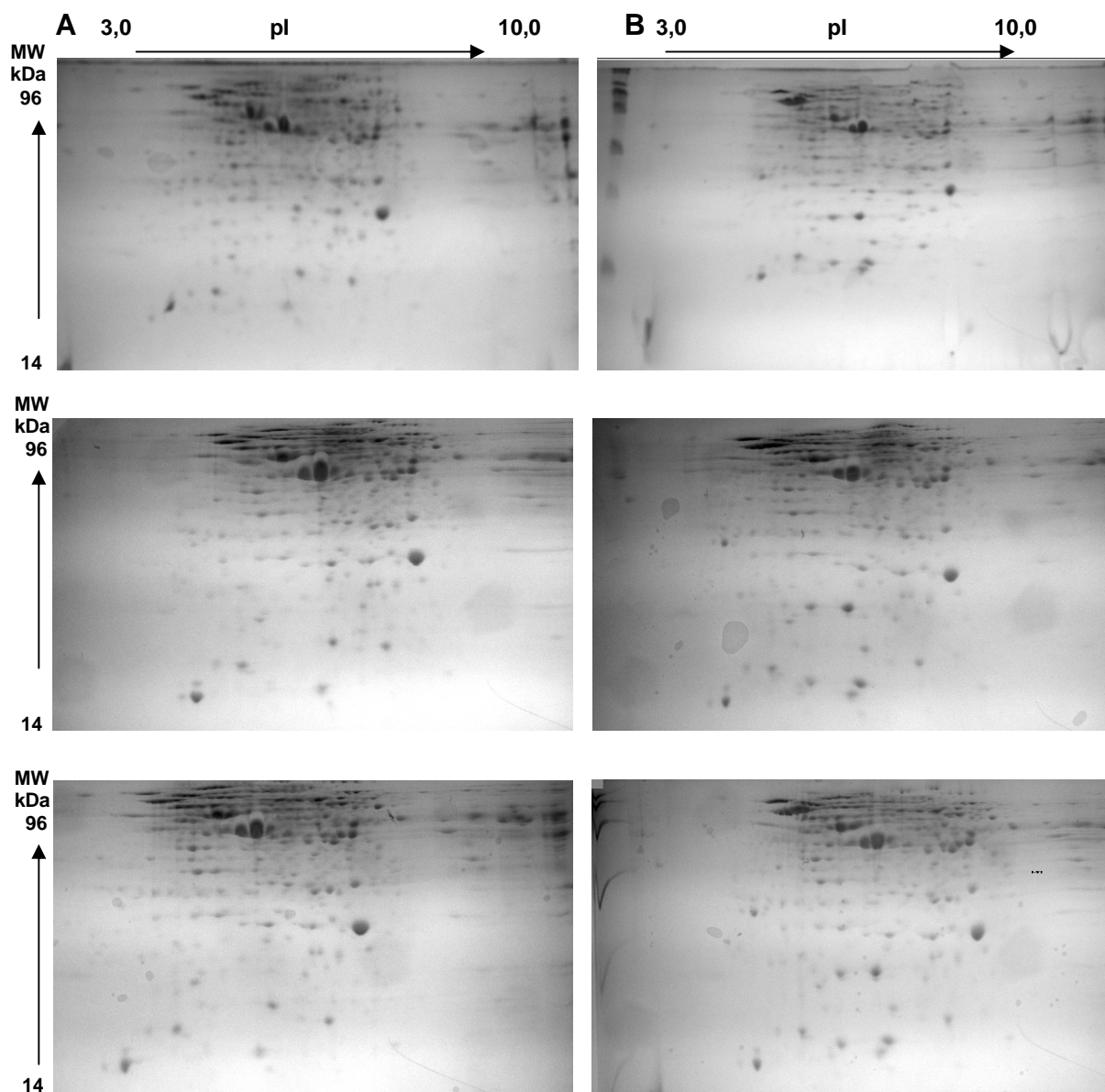
Para determinar quais proteínas tiveram seu padrão de expressão alterado após o choque térmico, uma amostra cultivada a 30°C e uma amostra submetida à temperatura de 42°C durante 30 minutos foram analisadas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão foi utilizada uma faixa de pH de 3 a 10 para separar as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico. Resultados anteriores sugerem que a maior parte das proteínas expressas em *H. seropedicae* encontra-se nesse faixa de pI (CHAVES, 2008). Na segunda dimensão as proteínas foram

separadas de acordo com sua massa molecular em gel de poliacrilamida 15% (acrilamida 20:1 bis-acrilamida). Em cada condição testada foram obtidos três géis.

A Figura 5 mostra as imagens dos géis obtidos para ambas as condições, controle e estresse térmico. O padrão de corrida em gel bidimensional das proteínas obtidas nas condições controle foi similar ao mapa de referência de proteínas citosólicas proposto por Chaves e colaboradores (2008). As imagens dos géis foram analisadas com o programa ImageMaster 2D Platinum e a partir desta análise foram selecionados os pontos protéicos que apresentaram diferenças qualitativas e/ou quantitativas.

Na análise dos géis obtidos foram observados pontos protéicos presentes em ambas as condições testadas (controle e após choque térmico) e pontos presentes apenas em uma das condições. Além disso, foram observados pontos com variação quantitativa de uma condição para outra. A Figura 6 mostra a indicação dos 11 pontos protéicos que foram selecionados e retirados para identificação através de espectrometria de massas. Destes, cinco pontos foram retirados de géis correspondentes à condição controle (30°C) (Figura 6A) e 11 pontos foram retirados de géis correspondentes à condição de estresse térmico (42°C) (Figura 6B).

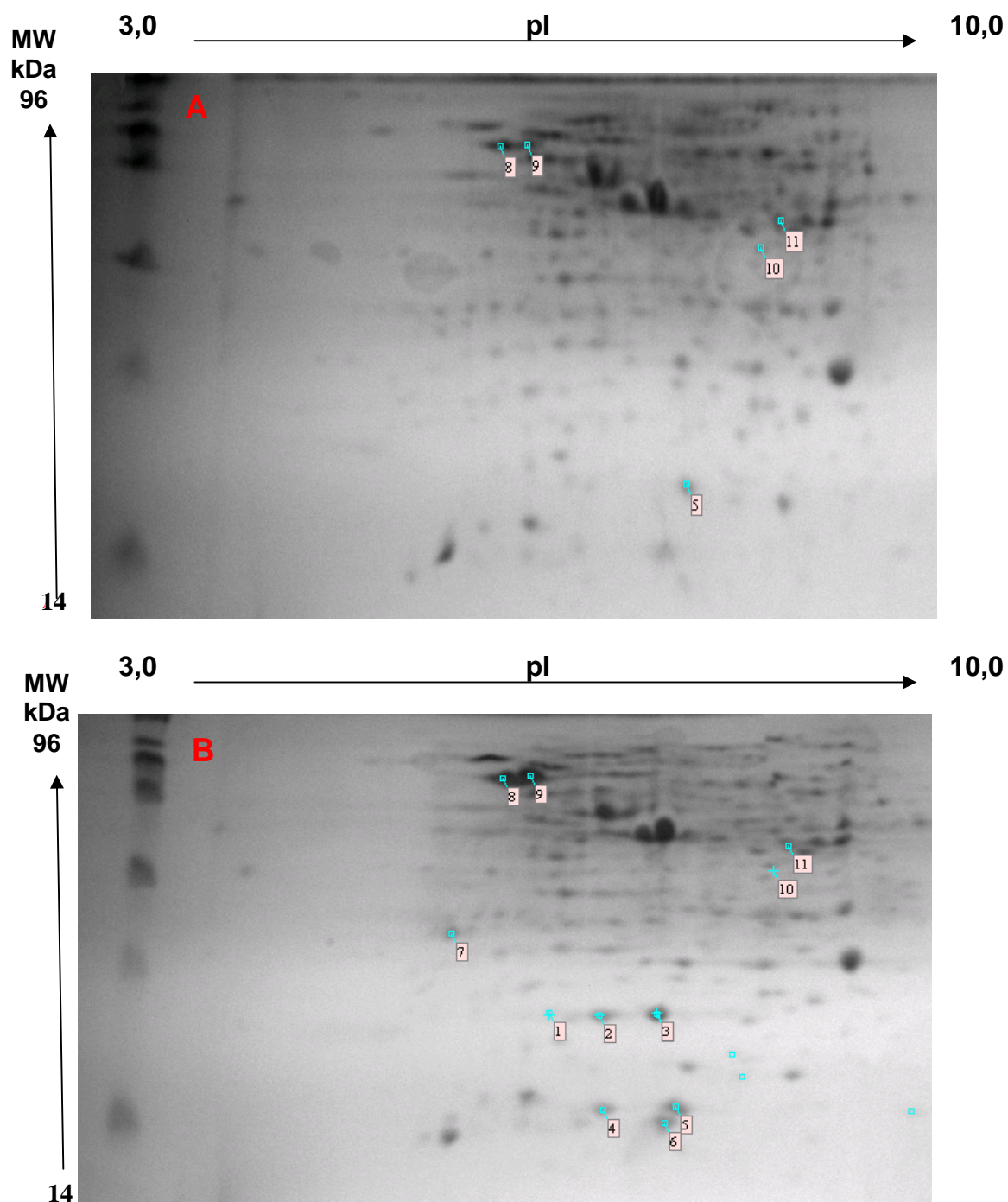
FIGURA 5 – PERFIL PROTÉICO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.



A primeira dimensão foi realizada em gradiente de pH 3-10 e a segunda dimensão por eletroforese SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados com Coomassie Blue Coloidal. A, Extrato obtido de células cultivadas na condição controle 30°C; B, Extrato obtido de células após exposição a 42°C por 30 minutos.



FIGURA 6 - GEL REPRESENTATIVO DO PERFIL PROTEICO DE *H. seropedicae* MOSTRANDO OS PONTOS RETIRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO



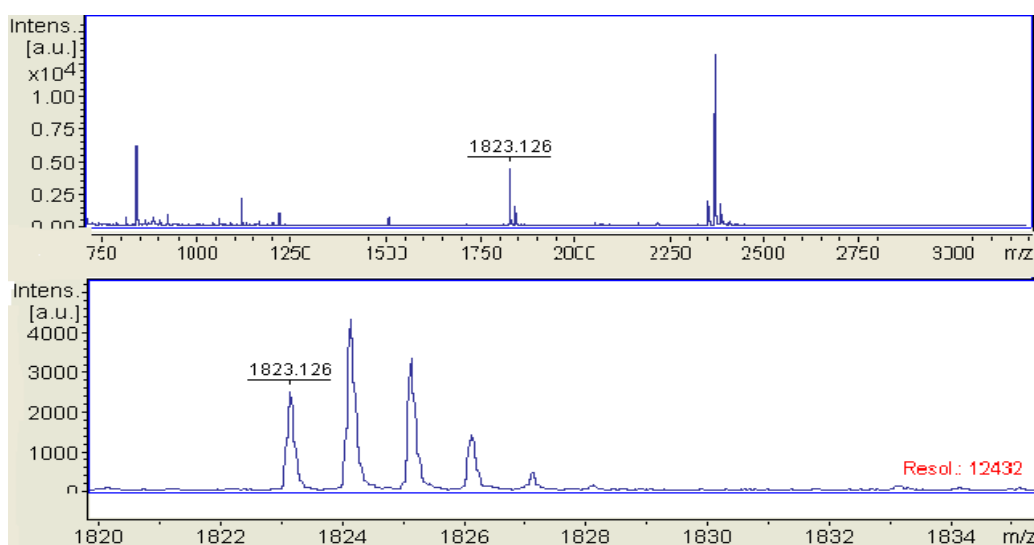
Eletoforese bidimensional de proteínas obtidas de células de *H. seropedicae* cultivadas a 30°C (A) ou após choque térmico de 30 min a 42°C (B). A primeira dimensão foi realizada em gradiente de pH 3-10 e a segunda dimensão em SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados com coomassie coloidal. Os números representam os pontos protéicos retirados para identificação.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE *Herbaspirillum seropedicae* COM EXPRESSÃO ALTERADA APÓS O CHOQUE TÉRMICO

Neste trabalho, a eletroforese bidimensional foi a ferramenta utilizada para identificar as proteínas selecionadas das replicatas dos géis obtidos com extratos de células submetidas ao estresse térmico ou não. Através desta ferramenta, é possível determinar a massa molecular, o ponto isoelétrico, o volume e o número de pontos protéicos em uma amostra biológica. Os pontos protéicos de interesse foram retirados dos géis das duas condições, e digeridos com a enzima tripsina como descrito na metodologia.

Após a digestão trípica, a massa molecular dos peptídeos foi determinada utilizando o espectrômetro de massas Autoflex ToF-ToF (Bruker Daltonics) e o programa Flex Control versão 3.0 (Bruker Daltonics). Esta análise fornece um espectro com a razão massa/carga dos peptídeos trípticos obtidos de cada um dos pontos protéicos retirados dos géis. As proteínas foram identificadas através da comparação entre as massas obtidas pela digestão trípica dos pontos protéicos e a massa dos peptídeos teóricos obtidos do banco de dados do genoma de *H. seropedicae* (GENOPAR). A Figura 7 mostra o perfil dos peptídeos obtidos para o ponto protéico identificado na figura 6 com o número 1, que foi identificado como a proteína lbpA.

FIGURA 7 – ESPECTRO DE MASSAS DA PROTEÍNA lbpA de *H. seropedicae*



A- Perfil dos peptídeos obtidos pela digestão trípica; B – Detalhe do pico de 1823,126 Da mostrando o perfil monoisotópico com resolução 12432.



No total foram identificados nove pontos protéicos correspondentes a quatro proteínas diferentes (Tabela 3). Entre estas proteínas, duas foram identificadas nas condições controle e de choque térmico: um ponto protéico da GroES (ponto 6) e duas isoformas de GroEL (pontos 8 e 9). Outros seis pontos identificados foram encontrados apenas na condição de choque térmico: a proteína GrpE (ponto 7), três isoformas de IbpA (pontos 1, 2 e 3) e duas isoformas da GroES (pontos 4 e 5). As isoformas da IbpA e GroEL são derivadas de um mesmo gene, e nas isoformas de GroES são derivadas de dois diferentes genes.

O gel referencial proposto para as proteínas citosólicas de *H. seropedicae* apresenta dois pontos protéicos correspondentes à chaperona GroEL, um ponto protéico para a cochaperona GroES e um ponto para a proteína GrpE (CHAVES, 2008). As posições destes pontos protéicos no gel de referência são concordantes com os encontrados neste trabalho. No gel referencial não foram identificados pontos correspondes à proteína IbpA.

TABELA 3 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RETIRADAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

Ponto protéico	Mowse Score	Observado		Teórico		Matches	Cb (%)	ORF	Proteína	Resposta ao choque térmico
		pI	MM kDa	pI	MM kDa					
1	114	5,40	18	5,77	17,25	5/14	57	266.0300	IbpA	Induzida
2	1,73e+004	5,76	18	5,77	17,25	7/16	47	266.0300	IbpA	Induzida
3	1,24e+006	6,18	18	5,77	17,25	9/21	58	266.0300	IbpA	Induzida
4	2,12e+003	5,62	16	5,81	10,53	3/6	48	287.0013	GroES	Induzida
5	7,01e+003	6,31	16	5,81	10,53	4/20	37	287.0013	GroES	Induzida
6	1,97e+004	6,23	15	5,83	11,48	7/25	53	283.1146	GroES	Inalterada
7	1,59e+003	4,69	23	4,87	20,26	4/9	31	260.0043	GrpE	Induzida
8	1,91e+008	5,26	51	8,88	51,07	13/36	25	287.0025	GroEL	Inalterada
9	4,92e+007	5,06	51	8,88	51,07	9/16	18	287.0025	GroEL	Inalterada

Dados referentes às proteínas identificadas; Mowse score – algoritmo de identificação que mostra a similaridade nos picos peptídicos teóricos e observados; pI - pH isoelétrico; MM - massa molecular; Matches – relação entre o número de peptídeos idênticos aos observados e o número de peptídeos teóricos da proteína candidata; Cb – porcentagem de cobertura dos peptídeos observados que

coincidiram com os teóricos; ORF- identidade anotada no genoma de *H. seropedicae*.

#### 4.4 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

A resposta ao choque térmico é bem descrita para alguns organismos como *E. coli*. No entanto para *H. seropedicae* não existem relatos na literatura. Existem duas chaperonas moleculares estudadas em detalhes em *E. coli* que apresentam variação de concentração após choque térmico: DnaK (e suas cochaperonas DnaJ e GrpE) e GroEL (e sua cochaperona GroES) (BUKAU & HORWICH, 1998).

Pequenas proteínas de choque térmico tais como IbpA e IbpB (16 kDa) também foram descritas para *E. coli* (ALLEN *et al.*, 1992). Em *H. seropedicae* apenas IbpA foi identificada, já que não existe no genoma o gene para IbpB. Resultados anteriores mostraram que esta proteína era expressa apenas após choque térmico a 42°C por 15 minutos como três pontos protéicos distintos (SILVEIRA, 2005). Estas isoformas também estão presentes após 30 minutos de choque térmico, sugerindo que sua presença seja importante para os processos celulares durante o choque térmico (Figura 8). Em *E. coli*, IbpA e IbpB participam da formação de corpos de inclusão e direcionam proteínas desnaturadas para as chaperonas DnaK e GroEL ou para degradação (Figura 2) (ALLEN *et al.*, 1992; NARBERHAUS, 2002).

Várias modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação de resíduos de serina, desamidação, acetilação e glicosilação, foram descritas para as pequenas proteínas de choque térmico (NARBERHAUS, 2002). É possível que a proteína IbpA de *H. seropedicae* sofra uma fosforilação, uma vez que o ponto isoelétrico da proteína foi alterado sem afetar substancialmente a massa molecular visualizada em gel bidimensional. Através da análise das massas dos peptídeos obtidos pela digestão trípica, seria possível determinar um suposto peptídeo alterado, mas esta identificação não foi possível neste trabalho.

Em estudos anteriores, a DnaK foi identificada nas duas condições, controle e de estresse (SILVEIRA, 2005), mas neste trabalho o perfil de peptídeos não possibilitou a identificação, apesar de o ponto referente à proteína estar presente nas duas condições. Uma das cochaperonas da DnaK, a proteína GrpE, foi identificada apenas na condição de estresse (Figura 9). O mapa de referência de *H.*

*seropedicae* apresenta um ponto protéico para GrpE obtido a partir de extrato de células cultivadas a 30°C (CHAVES, 2008). No entanto, este ponto não foi identificado na condição controle deste trabalho. A outra cochaperona da DnaK, a proteína DnaJ, não foi identificada entre as proteínas retiradas para esta análise.

Na análise dos géis obtidos com extratos na condição de estresse (Figura 6) foram observados dois pontos protéicos identificados como GroEL com ponto isoelétrico de 5,06 e 5,26, indicando a presença de isoformas modificadas pós-traducionalmente e com níveis de expressão similares (Figura 10). Em *Sinorhizobium meliloti*, duas isoformas desta chaperona também foram encontradas em resposta ao choque térmico (NATERA *et al.*, 2000).

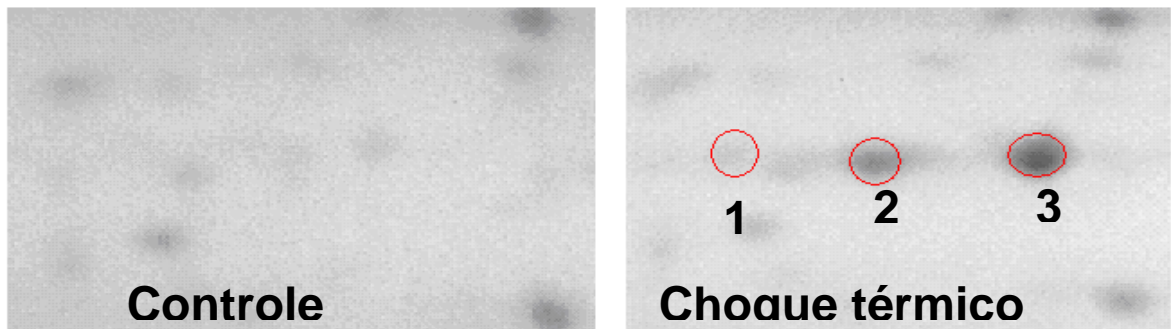
Em *Streptococcus pyogenes*, as proteínas DnaK e GroEL são induzidas por choque térmico de 42°C após 5 minutos de estresse, e após 30 minutos esta indução voltava aos níveis basais (LAPORT *et al.*, 2002).

A cochaperona GroES foi identificada em três pontos protéicos distintos, com pontos isoelétricos diferentes: 5,62, 6,23 e 6,31 (Tabela 3). O ponto protéico número 6 foi identificado como GroES, codificado pela ORF 283,1146 ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)), e encontra-se presente em ambas as condições, apresentando expressão constitutiva, sem diferença quantitativa nas condições controle e de estresse. Os pontos de números 4 e 5 também foram identificados como isoformas da GroES, mas estas isoformas são codificadas por um segundo gene de *H. seropedicae*, ORF 287,0013, que parece ser expresso apenas na condição de estresse térmico. A presença de modificação pós-traducional para GroES não foi ainda descrita na literatura. A análise dos picos da digestão da proteína não permitiu sugerir o possível tipo de modificação. Os dados de identificação das GroES estão representados na Figura 11.

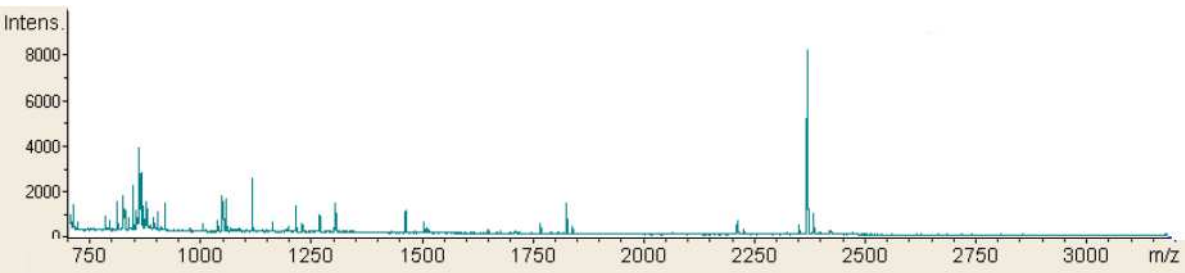
Em resumo, o choque térmico a 42°C por 30 minutos em células de *H. seropedicae* permitiu a identificação de um conjunto de nove pontos protéicos referentes a seis proteínas (GroEL, GroES 1, GroES 2, IbpA e GrpE), sendo que GroEL, GroES 2 e IbpA apresentaram isoformas. A proteína GrpE, as três isoformas de IbpA e as duas isoformas da GroES foram identificadas apenas na condição de choque térmico. Em *E. coli*, outras proteínas relacionadas a resposta ao choque térmico foram identificadas, como a cochaperona DnaJ, a proteína IbpB e as proteases ClpB, HtpG, FtsH e UspA. Estas proteínas foram encontradas após choque térmico de 42°C por 15 minutos (SHIRAI *et al.*, 1996).

FIGURA 8 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA IbpA

A



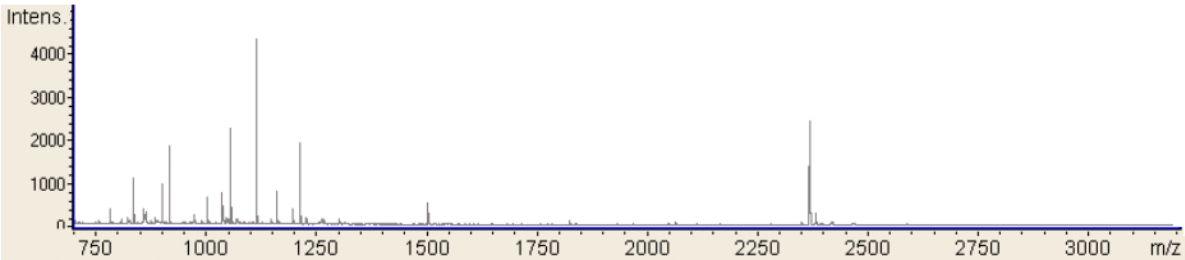
B1



C1

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
1052,5730	1052,5563	15,8893	49	58	(R)ITMAVAGFAR(S)	1Met-ox
1052,5730	1052,6104	-35,5494	124	132	(R) EIPALKPR(K)	
1111,5960	1111,5788	15,4868	3	11	(R)TFDLSPLYR(T)	
1209,5630	1209,5686	-4,6556	19	28	(R)LAQMFDNAQR(A)	1 Met-ox
1501,7930	1501,7611	21,2685	133	145	(R)KIEIGSQDDNVQR(L)	
2368,2530	2368,1461	45,1338	29	48	(R)ADQPSYPYPYNIELVAEDKYR(I)	

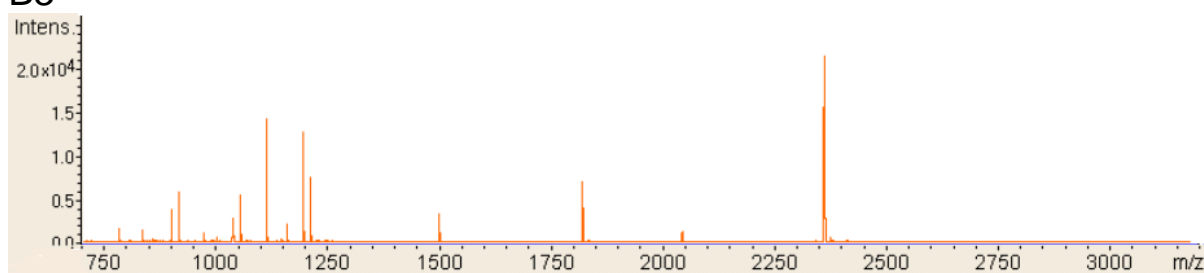
B2



## C2

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
1036,5110	1036,5614	-48,5847	49	58	(R)ITMAVAGFAR(S)	
1052,5570	1052,5563	0,6882	49	58	(R)ITMAVAGFAR(S)	1 Met-ox
1052,5570	1052,6104	-50,7498	124	132	(R)EIPALKPR(K)	
1111,5780	1111,5788	-0,7064	3	11	(R)TFDLSPLYR(T)	
1193,5640	1193,5737	-8,1408	19	28	(R)LAQMFDNAQR(A)	
1209,5500	1209,5686	-15,4032	19	28	(R)LAQMFDNAQR(A)	1 Met-ox
1501,7870	1501,7611	17,2732	133	145	(R)KIEIGSQDDNVQR(L)	

## B3



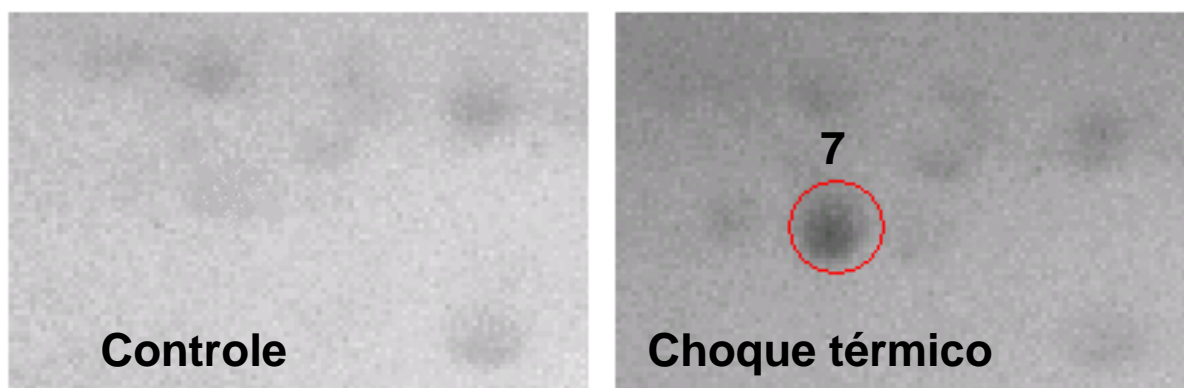
## C3

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
1036,5750	1036,5614	13,1579	49	58	(R)ITMAVAGFAR(S)	
1052,5940	1052,5563	35,8407	49	58	(R)ITMAVAGFAR(S)	1 Met-ox
1052,5940	1052,6104	-15,5990	124	132	(R)EIPALKPR(K)	
1111,5970	1111,5788	16,3864	3	11	(R)TFDLSPLYR(T)	
1193,5990	1193,5737	21,1829	19	28	(R)LAQMFDNAQR(A)	
1209,5820	1209,5686	11,0525	19	28	(R)LAQMFDNAQR(A)	1 Met-ox

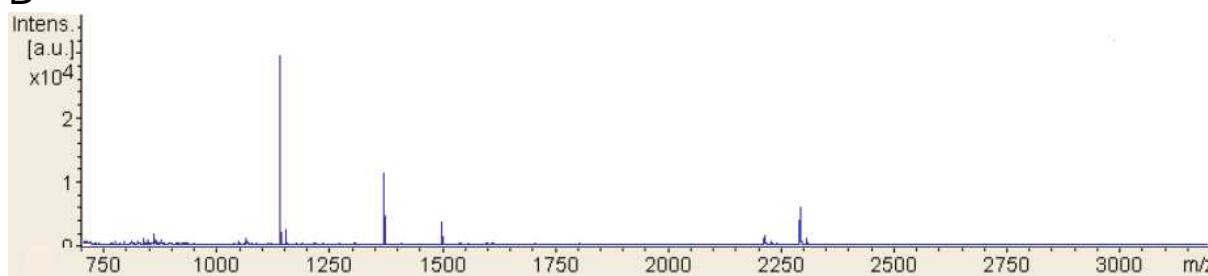
A – Gel bidimensional mostrando os pontos protéicos referentes às isoformas da proteína lbpA; O gel a esquerda representa a condição controle e o gel à direita a condição de choque térmico; B1- Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 1; C1 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos trípticos identificados referentes a proteína do ponto 1; B2- Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 2; C2 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados referentes a proteína do ponto 2; B3- Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 3; C3 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados referentes a proteína do ponto 3. A proteína lbpA teve uma cobertura de 47% (71/151 AA's), 58% (88/151 AA's) e 58% (88/151 AA's) para os pontos 1, 2 e 3, respectivamente.

FIGURA 9 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GrpE

A



B



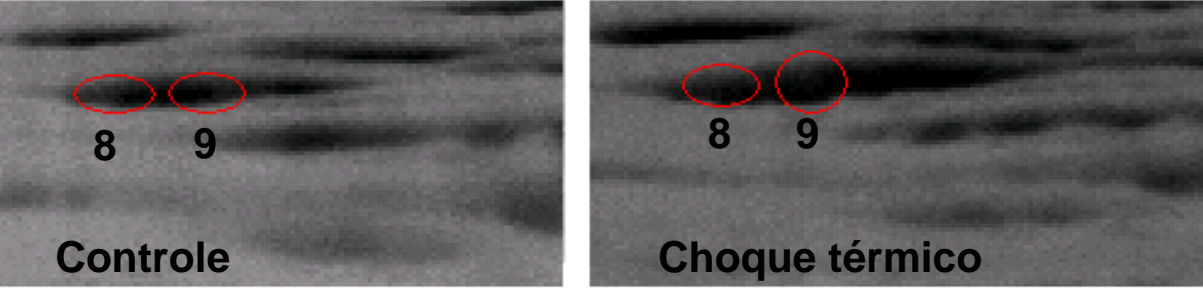
C

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
1133,6020	1133,5955	5,7358	51	60	(K) AAELQDAFLR(A)	
1365,9020	1365,8582	32,0714	177	189	(R) LLRPALVTVAQGK(*)	
1365,9020	1365,8582	32,0714	177	190	(R) LLRPALVTVAQGK*(-)	
1494,8490	1494,8208	18,8608	82	95	(K) FAIEGFAESLLAVK(D)	
2289,3510	2289,2203	57,1004	148	169	(K) HQA VSAVPAEQEANTVVAVLQK(G)	

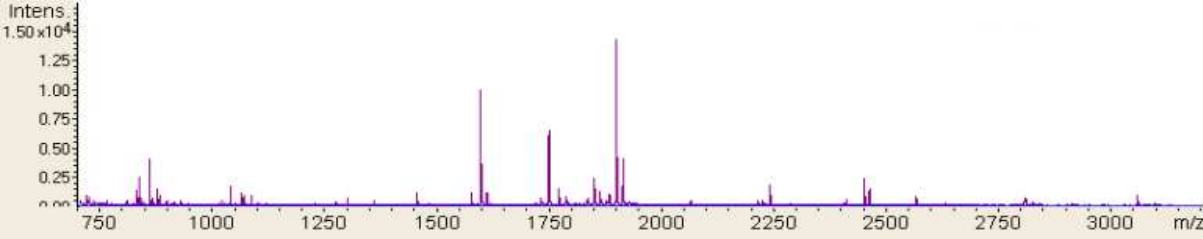
A – Gel bidimensional mostrando o ponto protéico referente a proteína GrpE; O gel a esquerda representa a condição controle e o gel à direita a condição estressada; B- Perfil de massa dos peptídeos tripticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 7; C – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados da proteína. A proteína GrpE teve uma cobertura de 31% (59/190 AA's).

FIGURA 10 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA GroEL

A



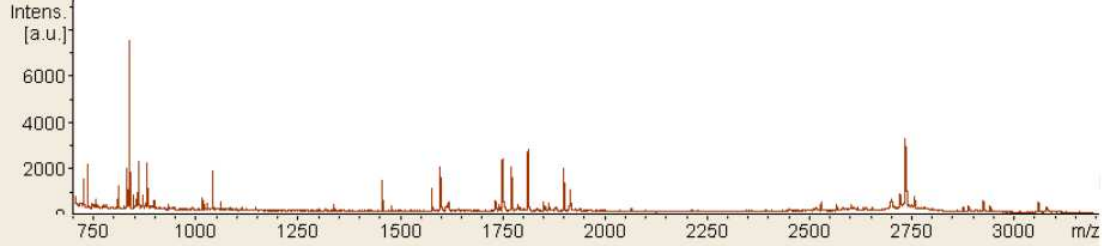
B1



C1

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
1034,5450	1034,5192	24,9184	372	381	(K) VGAATEVEMK(E)	
1295,6820	1295,6636	14,2185	97	108	(K) YVAAGFNPTDLK(R)	
1355,6470	1355,6079	28,8334	342	353	(R) TQIGEATSDYDR(E)	
1451,8110	1451,7647	31,9001	97	109	(K) YVAAGFNPTDLKR(G)	
1572,8230	1572,7698	33,8043	189	201	((R) GYLSPYFINNQE(K)	
1593,9640	1593,8964	42,3923	396	412	(R)AAVEEGVVPGGGVALLR(A)	
1729,0270	1728,9576	40,1199	202	216	(K)QIVALDNPFIILLFDK(K)	

B2



## C2

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
1034,6200	1034,5192	97,4158	372	381	(K) VGAATEVEMK(E)	
1451,9040	1451,7647	95,9600	97	109	K) YVAAGFNPTDLKR(G)	
1573,1480	1572,7698	240,4461	189	201	(R) GYLSPYFINNQEK(Q)	
1594,0590	1593,8964	101,9946	396	412	(R)AAVEEGVVPGGGVALLR(A)	
1729,3780	1728,9576	243,1324	202	216	(K)QIVALDNPFIILLFDK(K)	pyroGlu
1746,4330	1745,9842	257,0564	202	216	(K) QIVALDNPFIILLFDK(K)	
1808,5420	1808,0646	264,0618	218	233	(K) ISNIRDLLPVLEQVAK(A)	
1895,4110	1894,8857	277,2367	173	188	(K) SLENELDIVEGMQFDR(G)	
1911,4340	1910,8806	289,6137	173	188	(K)SLENELDIVEGMQFDR(G)	1Met-ox

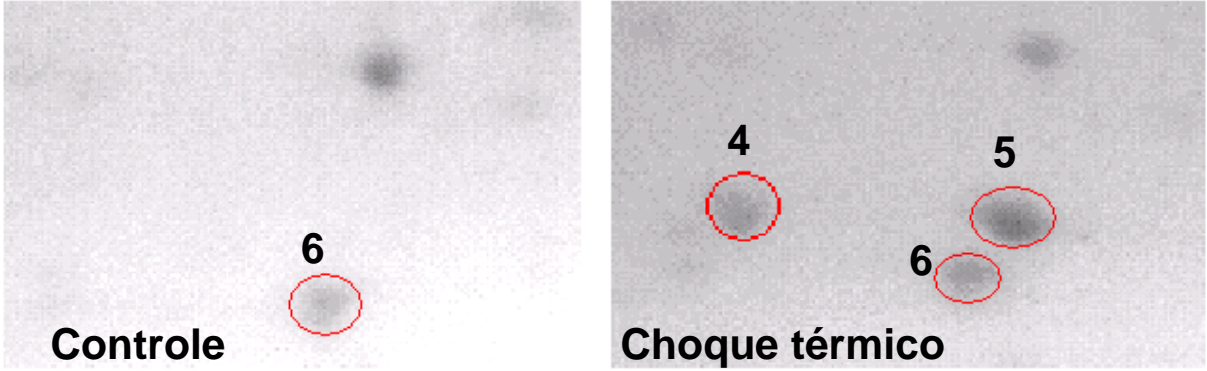
A – Gel bidimensional mostrando os pontos protéicos referentes às isoformas da proteína GroEL; O gel a esquerda representa a condição controle e o gel à direita a condição de choque térmico; B1- Perfil de massa dos peptídeos tripticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 8; C1 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos tripticos identificados referentes a proteína do ponto 8; B2- Perfil de massa dos peptídeos tripticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 9; C2 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados referentes a proteína do ponto 9. A proteína GroEL teve uma cobertura de 25% (136/541 AA's) e 18% (100/541 AA's), para os pontos 8 e 9, respectivamente.



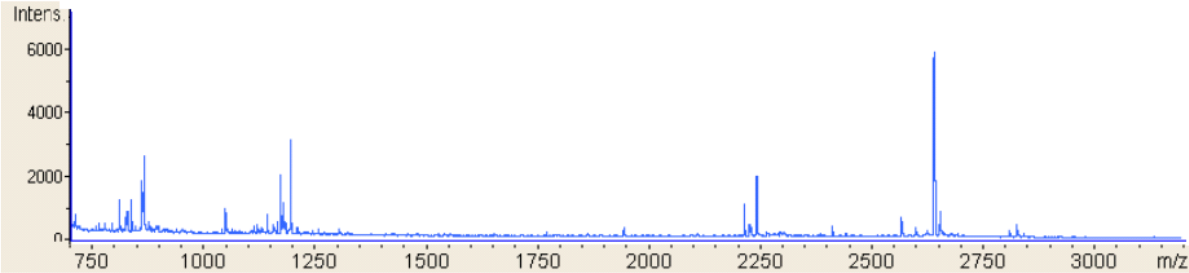
FIGURA 11 – DADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA GroES

A

6



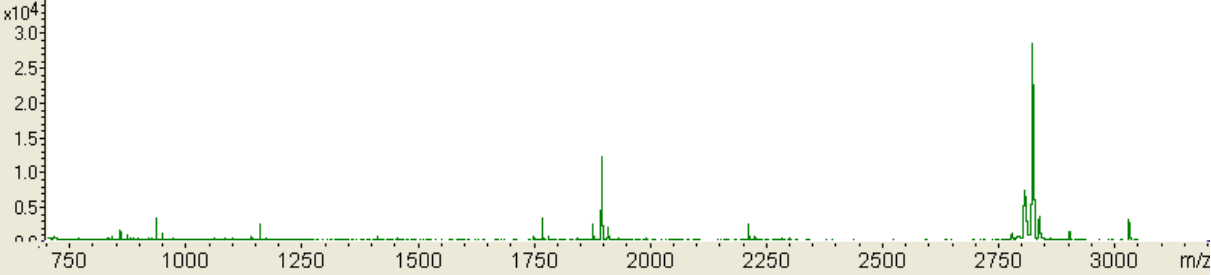
B1



C1

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
838,5180	838,4648	63,4989	14	19	(K) RIEHQR(Q)	
856,5780	856,4892	103,6301	48	55	(R) VLPDGSLR(A)	
932,6340	932,5318	109,6205	3	9	(K) LRPLYDR(V)	
947,6720	947,5566	121,7941	61	69	(K) VGDLVLFGK(Y)	
1156,8280	1156,6578	147,1793	77	86	(K) LDGEELLVLR(E)	
1766,1710	1765,8285	193,9765	87	102	(R) EEDIFGVFEPAAAQDK(K)	
1894,2810	1893,9234	188,7965	87	103	(R)EEDIFGVFEPAAAQDKK(A)	

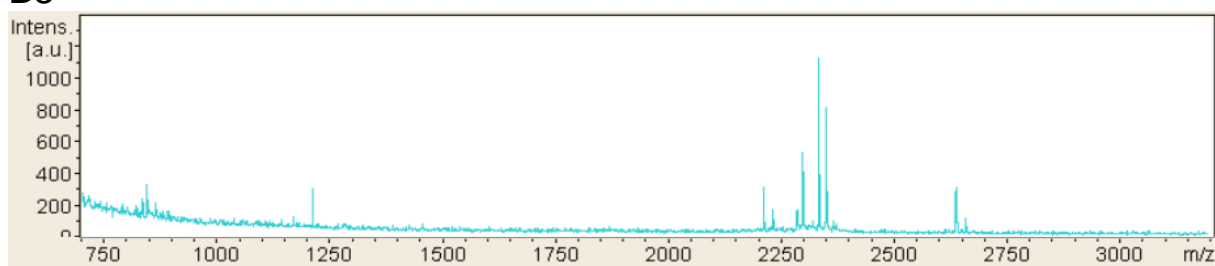
B2



## C2

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
2408,4460	2408,1062	141,1069	73	94	(R)TASWRSCSAACAPLAWPAMASR(A)	
2564,6100	2564,1783	168,3507	78	100	(R)SCSAACAPLAWPAMASRAAICWR(Q)	
2651,8920	2651,2499	242,1925	18	41	(R)LTWTASHSMGTVTGLSWWAMANSR(A)	
2807,8810	2807,3510	188,7907	17	41	(R)RLTWTASHSMGTVTGLSWWAMANSR(A)	

## B3



## C3

m/z	MH+	Delta ppm	Posição primeiro AA	Posição último AA	Sequência do peptídeo	Modificação proposta
2333,4120	2333,2063	88,1730	77	96	(K)IDGQELLVMREEDLFAVVEK(*)	
2349,4480	2349,2012	105,0618	77	96	(K)IDGQELLVMREEDLFAVVEK(*)	1 Met-ox
2637,7210	2637,3736	131,7407	21	47	(K)TASGIVLPDAATEK PDQGEVLAVGNGK(I)	

A – Gel bidimensional mostrando os pontos protéicos referentes às isoformas da proteína GroES; O gel a esquerda representa a condição controle e o gel à direita a condição de choque térmico; B1- Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 4; C1 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados da proteína referente ao ponto 4. B2- Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 5; C2 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados referentes a proteína do ponto 5; B3- Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF do ponto 6; C3 – Tabela mostrando os dados dos peptídeos identificados referentes a proteína do ponto 6. A proteína GroES teve uma cobertura de 48% (47/97 AA's), 53% (57/106 AA's) e 37% (53/142 AA's) para os pontos 4, 5 e 6, respectivamente.

## 5 CONCLUSÕES

- A análise dos géis de eletroforese bidimensional revelou 11 pontos protéicos com concentração alterada após choque térmico de 42°C por 30 minutos em *Herbaspirillum seropedicae*. Estes pontos protéicos correspondem a cinco proteínas (GroEL, GroES, lbpA e GrpE) e suas isoformas.
- A proteína GroEL foi identificada em dois pontos protéicos;
- Foram encontradas 2 proteínas GroES, denominadas GroES 1 e GroES 2 representadas por ORFs diferentes;
- A GroES representada pela ORF 283,1146 é expressa constitutivamente, enquanto que a GroES de ORF 287,0013 parece responder ao choque térmico;
- As 3 isoformas de lbpA identificadas após choque térmico 42°C por 15 minutos continuaram presentes após 30 minutos;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v.402, p.715-720, 1999.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.**, v.101, p.269-295, 2001.

ALLEN, S. P., POLAZZI, J. O., GIERSE, J. K. & EASTON, A. M. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *E. coli*. **J. Bacteriol.**, v.174, p.6938-6947, 1992.

ASEA, A., KABINGU, E., STEVENSON, M. A., CALDERWOOD, S. K. HSP70 peptide-bearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. **Cell Stress Chaperones**, v.5, p.425-431, 2000.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov, sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis Rehavot**, v.13, p.65-73, 1992.

BARREIRO, C., GONZÁLEZ-LAVADO, E., BRAND, S., TAUCH, A., MARTIN, J. Heat Shock Proteome Analysis of Wild-Type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a Spontaneous Mutant Lacking GroEL1, a Dispensable Chaperone. **J. Bacteriol.**, v.187, p.884-889, 2005.

BASTIAN, F.; COHERN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plat Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BELIZÁRIO JE. Proteoma: o desafio tecnológico do século 21. **Ciência Hoje**, v.27, n.162, p.78-81, Julho, 2000.

BENDT, A. K., KRÄMER, R. BURKOVSKI, A. SCHAFFER, S. BOTT, M. BUSKER, E. HERMANN, T. PFEFFERLE, W. AND FARWICK, M. Towards a phospho-proteome map of *Corynebacterium glutamicum*, **Proteomics**, v.3, p.637–1646, 2003.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Reviews: TIBTECH.**, v.17, p.121-127, 1999.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.4, p.343-350, 2001.

BOCHKAREVA, E.S., GIRSHOVICH, A. and BIBI, E. Identification and characterization of the *Escherichia coli* stress protein UP12, a putative in vivo substrate of GroEL. **Eur. J. Biochem.**, v.269, p.3032-3040, 2002.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**, The Hague, v.174, p.195-209, 1995.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BUKAU, B. Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p.671-680, 1993.

BUKAU, B., A. L. HORWICH. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell** v. 92, p. 351-366, 1998.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Sci.**, v.1, p.1-15, 2003.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v. 372, p. 121-145, 1998.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**, v.49, p.58-62, 2002.

CHAVES, D. F. S. ; FERRER, P. P. ; CRUZ, L. M. ; MONTEIRO, R. A. ; SOUZA, E. M. ; PEDROSA, F.O. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, v.7, p.3759-3763, 2007.

CHAVES, Daniela Fojo Seixas. Análise e identificação de proteínas celulares e proteínas secretadas por *Herbaspirillum seropedicae* Curitiba, 2008. 156 f. Tese

(doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CRAIG, E. A. & GROSS, C. A. Is hsp70 the cellular thermometer? **Trends Biochem Sci**, v.16, p.135–139, 1991.

CRUZ, M. L.; SOUZA E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p.2375-2379, 2001.

DIEZ, A., GUSTAVSSON, N., NYSTRÖM, T. The universal stress protein A of *Escherichia coli* is required for resistance to DNA damaging agents and is regulated by a RecA/FtsK-dependent regulatory pathway. **Mol. Microbiol.**, v.36, p.1494 –1503, 2000.

DOBSON, C. J., GERRARD, J. A., PEARCE, F. G. Dihydrodipicolinate synthase is not inhibited by its substrate, (S)-aspartate  $\beta$ -semialdehyde. **Biochem. J.**, v.377, p.757–762, 2004.

DUNN, M. Proteome Analysis. Disponível em: <<http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/1998/dunn.htm>> Acesso em: 10 fev. 2003.

ELBELTAGY A.; NISHIOKA K.; SATO T.; SUZUKI H.; YE B.; HAMADA T.; ISAWA T.; MITSUI H.; MINAMISAWA K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.11, p.5285-93, 2001.

EWALT, K. L., HENDRICK, J. P., HOURY, W. A., HARTL, F. U. In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. **Cell**, v.90, p.491- 500, 1997.

FAYET, O., ZIEGELHOFFER, T., GEORGOPOULOS, C. The GroES and GroEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. **J. Bacteriol.**, v.171, p.1379 – 1385, 1989.

FEDER, M. E., and HOFMANN G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Ann. Rev. Physiology**, v.61, p.243-282, 1999.

FRANCO, A.A. & FARIA, S.M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biol. Biochem.**, v.29, p.897-903, 1997.

GAMER, J., BUJARD, H. & BUKAU, B. Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, GrpE and the bacterial heat shock transcriptional factor s32. **Cell**, v.69, p.833–842, 1992.

GENOPAR, Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae*. [www.genopar.org.br](http://www.genopar.org.br)

GEORGOPOULOS, C. P., HENDRIX, R. W., CASJENS, S. R. & KAISER, A. D. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. **J. Molec. Biol.**, v.76, p.45–60, 1973.

GEORGOPOULOS, C. and WELCH, W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v.9, p.601-634, 1993.

GETHING, M-J. Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts. **Oxford Univ. Press**, 554pp, 1997.

GLOVER, J. R. and LINDQUIST, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. **Cell**, v.94, p.73-82, 1998.

GODOVAC-ZIMMERMANN J, BROWN LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, 20, p.1-57, 2001.

GÖRG, A.; BOGUTH, G.; DREWS, O.; HARDER, A.; OBERMAIER, C.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. 2002. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A Laboratory Manual. Disponível em: <<http://www.weihenstephan.de/blm/deg>> Acesso em 15 jan. 2006.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.66, p.39-63, 2002.

GROSS, C.A. Function and regulation of the heat shock proteins. In *Escherichia coli and Salmonella*: **Cellular and Molecular Biology**, p.1382-1399, 1996.

GUPTA, R. S., SINGH, B. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. **Curr. Biol.**, v.4, p.1104-1114, 1994.

GUPTA, R. S. Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. **Microbiol. Mol. Biol.**, v.62, p.1435-1491, 1998.

GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., MATHAN, N., REDDY, P. M., REINHOLD-HUREK, B. AND LADHA, J. K. Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2634-2645, 2001.

HARTL, F. U. and MARTIN, J. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.5, p.92-102, 1995.

HERBERT, B.R.; LARRY, J.L.; PACKER, N.H.; GOOLEY, A.A.; PEDERSON, S.K. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends Biotech.**, v.19, 2001.

HERMAN, C., THE´VENET, D., D'ARI, R., AND BOULOC, P. Degradation of s32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.3516–3520, 1995.

SEKIGUCHI, H., ARAKAWA, H., TAGUCHI, H., ITO, T., KOKAWA, R. AND IKAI, A. Specific Interaction between GroEL and Denatured Protein Measured by Compression-Free Force Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 484-490, 2003.

HOURY, W. A., FRISHMAN, D., ECKIRSKORN, C., LOTTSPEICH, F., HARTL, F. U. Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. **Nature**, v.402, p.147-154, 1999.

HUNGRIA, M. A., Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **R. Bras. Ci. Solo, Campinas**, v.18. p.339-364, 1994.

HUNT, J. F., WEAVER, A. J., LANDRY, S. J., GIERASCH, L. AND DEISENHOFER, J. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. **Nature**, v.379, p.37 – 45, 1996.

INDGE, B., The Nitrogen Cycle. **Biological Sciences Review**, vol. 13, p25-27, 2000.



JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. J. **Experimen. Bot.**, v.48, p.785-797, 1997.

JAMES E. K.; GYANESHWAR P.; MATHAN N.; BARRAQUIO W. L.; REDDY P. M.; IANNETTA P. P.; OLIVARES F. L.; LADHA J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.15, n. 9, p.894-906. 2002

JOLLY, C., MORIMOTO, R.I. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, No. 19, p. 1564-1572, 2000.

JUNGBLUT, P.R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infect.**, v.3, p.831-840, 2001.

KEDZIERKA, S., STANISZEWSKA, M. WEGRZYN, A. and TAYLOR, A. The role of DnaK/DnaJ and GroEL/GroES systems in the removal of endogenous proteins aggregated by heat-shock from *Escherichia coli* cells. **FEBS Lett.**, v.446, p.331-337, 1999.

KAZMI S, KRULL IS. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. **Pharma Genomics**, p.14-29, August, 2001.

KITAGAWA, M., MIYAKAWA, M., MATSUMURA, Y. E TSUCHIDO, T. *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. **Eur. J. Biochem.**, v.269, p.2907-2917, 2002.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.43, p.887-891, 1997.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v.26, p.231-243, 1975.

KONIECZNY, I., LIBEREK, K. Cooperative Action of *Escherichia coli* ClpB Protein and DnaK Chaperone in the Activation of a Replication Initiation Protein. **J. Biol. Chem.**, v.277, Issue 21, p.18483-18488, 2002.

KÖPKE, A. Proteomics – a new drug discovery tool. Disponível em: <<http://www.wita-proteomics.com>> Acesso em: 01 nov. 2003.

KUCHARCZYK, K., LASKOWSKA, E. & TAYLOR, A. Response of *E. coli* cell membranes to induction of  $\lambda$ cl857 prophage by heat shock. **Mol. Microbiol.**, v.5, p.2935-2945, 1991.

KUCZYNSKA, D., KŁDZIERSKA, S., MATUSZEWSKA, E., LUND, P., TAYLOR, A., LIPINSKA, B., LASKOWSKA, E. The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. **Microbiology**, v.148, p.1757-1765, 2002.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAPORT, M. S., CASTRO, A. C. D., VILLARDO, A., LEMOS, J. A. C., BASTOS, M. C. F., GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Expression of the Major Heat Shock Proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: A Comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 42, p. 264–268, 2001.

LASKOWSKA, E., KUCZYNSKA-WISNIK, D., SKÓRKO-GLONEK, J. & TAYLOR, A. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. **Mol. Microbiol.**, v.22, p.555-571, 1996.

LINDQUIS S. The heat shock response. **Ann. Rev. Biochem.**, v.55, p.1151-1191, 1986.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **J. Chromatography B**, v.722, p.191–202, 1999.

MACARIO, A. J. L., MACARIO, E. C. The archaeal molecular chaperone machine: Peculiarities and paradoxes. **Genetics**, v.152, p.1277-1283, 1999.

MANN, M., HENDRICKSON, R.C., PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p.437-473, 2001.

MANN, M. and JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotech.**, v.21, p.255-261, 2003.

MAYER, M. P. and BUKAU, B. Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. **Biol. Chem.**, v.379, p.261-26, 1998.

MELLONI, R., MOREIRA, F. M. S., NÓBREGA, R. S. A., SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação(1). **R. Bras. Ci. Solo**, v.30, p.235-246, 2006.

MELNICK, J. and ARGON, Y. Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. **Immunology Today**, v.5, p.243-250, 1995.

MOGK, A., T. TOMOYASU, P. GOLOUBINOFF, S. RÜDIGER, D. RÖDER, H. LANGEN, AND BUKAU, B. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. **Embo J.**, v.18, p.6934–6949, 1999.

MORIMOTO, R.I., KROEGER, P.E., COTTO, J.J. The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. In *The Transcriptional Regulation of Heat Shock Genes: A Plethora of Heat Shock Factors and Regulatory Conditions*. Feige, U., Morimoto, R.I., Yahara, I., and Polla, B.S. (eds). Basle: **Birkhäuser-Verlag**, p.139–163, 1996.

MOTOJIMA, F., CHAUDHRY, C., FENTON, W. A., FARR, G. W., HORWICK, A. L. Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL. **PNAS**, v.42, p.15005-15012, 2004.

NARBERHAUS, F. Negative regulation of bacterial heat shock genes. **Molecular Microbiology**, v.31 (1), p.1365-2958, 1999.

NARBERHAUS, F.  $\alpha$ -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network. **Microbiol. Mol. Biology Rev.**, v.66, p. 64-93, 2002.

NATERA, S. H. A., GUERREIRO, N. AND DJORDJEVIC, N. A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.13, p.995–1009, 2000.

NOVER, L. Inducers of hsp synthesis: heat shock and chemical stressors. 5-40. In: Heat shock proteins. L. Nover (ed). **CRC Press**, Fl, 1991.

NYSTRÖM, T., NEIDHARDT, F. C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. **Mol. Microbiol.**, v.11, p.537 – 544, 1994.

OLIVER, S. Guilt-by-association goes global. **Nature**, v.403, p.601-603, 2000.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub> -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p. 205-215, 2002.

PANDA, M., YBARRA, J. AND HOROWITZ, P. M. High Hydrostatic Pressure Can Probe the Effects of Functionally Related Ligands on the Quaternary Structures of the Chaperonins GroEL and GroES. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.6253 – 6259, 2001.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.

PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annu. Rev. Genet.**, v.27, p.437-496, 1993.

PEDROSA, F. O.; GENOPAR CONSORTIUM. A report on the genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. p. 111-114. In Y. Wang, M. Lin, Z. Tian, C. Elmerich, and W. E. Newton (Ed.), Biological nitrogen fixation, sustainable agriculture and the environment. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005.

PERRET, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton, Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.64 (1), p.180-201, 2000.

QUIGLEY, P.M. KOROTKOV, K. BANEYX F. AND HOL, W.G. The 1.6-Å crystal structure of the class of chaperones represented by *Escherichia coli* Hsp31 reveals a putative catalytic triad, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.100, p.3137–3142, 2003.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, Jr., F. B.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and soil**, v.206, p.205–211, 1999.

RENSING, S. A. and MAIER, U-G. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. **J. Mol. Evol.**, v.39, p.80-86, 1994.

RITOSA, F. A. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v.18, p.571-573, 1962.

RON, E. Z., SEGAL, G., ROBINSON, M., GRAUR, D. Control elements in the regulation of bacterial heat shock response. In E. Rosenberg (ed.), **Microbial ecology and infectious disease**. ASM Press, p. 143-152, 1998.

RONCATO-MACARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; SOUZA, E. M.. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* express *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v.45, p.39-47, 2003a.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.N.; PODTELEJNIKOV, A.V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.14440-14445, 1996.

SHIRAI, Y; AKIYAMA, Y.; ITO, K. Suppression of *ftsH* Mutant Phenotypes by overproduction of Molecular Chaperones. **J. Bacteriol.**, v.178, No.4 p.1141–1145, 1996.

SILVEIRA, Gustavo Luis Lopes. Identificação de proteínas de choque térmico em *Herbaspirillum seropedicae* Curitiba, 2005. Monografia (Departamento de Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SPOTILA, J.R., E.A. Standora, D.P. Easton, and Rutledge, P.S. Bioenergetics, behavior, and resource partitioning in stressed habitats: biophysical and molecular approaches. **Physiol. Zool.**, v.62, p.253-285, 1989.

SUNDARAM, S., ROTH, C. M., AND YARMUSH, M. L. Pressure-induced dissociation of antigen–antibody complexes. **Biotechnol. Prog.**, v.14, p.773-781, 1998.

SCHULZ A, SCHWAB S, HOMUTH G, VERSTEEG S, SCHUMANN W. The *htpG* gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. **J. Bacteriol.**, v.179 (10), p. 3103-3109, 1997.

TANG, C.; ZHANG, W.; FENYO, D.; CHAIT, B.T. Assessing the performance of different protein identification algorithms. **48th ASMS Conference**, 2000.

TISSIERES, A., MITCHELL, H.K., TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. **J. Molec. Biol.**, v.85, p.389—398, 1974.

THOMAS, J., BANEYX, F. Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In Vivo. **J. Bacteriol.**, v.180, p.5165–5172. 1998.

VIPREY, V.; DEL GRECO, A.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol. Microbiol.**, v.28 (6), p.1381-1389 , 1998.

XU, Z., A. L. HORWICH, AND SIGLER, P. B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. **Nature**, v.388, p.741– 750, 1997.

YOUNG, J. P. W.; STALEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, H. J. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**, New York: Londres, p.943, 1992.

YURA, T., NAGAI, H., MORI, H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.47, p.321–350, 1993.

WANG, W., VINOCUR, B., SHOSEYOV, O., ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Plant Science** v.9, p.1360-1385 , 2004.

WAGNER K, MILIOTIS T, MARKO-VARGA G, BISCHOFF R, UNGER KK. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. **Analytical Chemistry**, v.74, p.809-820, 2002.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, p.103-113, 1999.

WEHR, T. Separation technology in proteomics. **LCGC**, v.19, n.7, p.702-711, 2001.

WESTERMEIER & NAVEN, R. Gel electrophoresis. In: *Electrophoresis in Practice — A Guide to Theory and Practice*, **VCH Publishers**, pp.210–212, 1993.

WESTERMEIER & NAVEN, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER & NAVEN, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VC, p.261, 2004.

WIECZOREK, R., STEINBUCHER, A., SCHMIDT, B. Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.135, p. 23–30, 1996.

WUNDERLICH, M., WERR, W., SCHÖFFL, F. Generation of dominant-negative effects on the heat shock response in *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a chimaeric HSF1 protein fusion construct. **The Plant Journal**, v.35, p.442-451, 2003.